

Aus dem Institut für Pathologie (Rudolf-Virchow-Haus)
des Universitätsklinikums Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin
Direktor Prof. Dr. M. Dietel



DISSERTATION

Thema:

**„CHARAKTERISIERUNG DES PROLIFERATIONSVERHALTENS
ÖSTROGEN-POSITIVER UND ÖSTROGEN-NEGATIVER ZELLEN
DES MAMMAKARZINOMS DURCH VERMESSUNG
ARGYROPHILER NUKLEOLUS-ORGANISIERENDER REGIONEN
(AgNORs)“**

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae
(Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der
Humboldt-Universität zu Berlin

von
Herrn Lukas Günther
geb. am 11.05.1971 in Suhl

Dekan: Prof. Dr. med. M. Dietel

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H. Guski
2. Prof. Dr. med. H. Martin
3. PD Dr. med. G. Haroske

eingereicht: Juni 1997

Datum der Promotion: 19.12.1997

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde eine neue Färbemethode zur simultanen Darstellung von Estrogenrezeptoren (ER) und argyrophilen Nukleolus-organisierenden Regionen (AgNORs) entwickelt, um die Proliferationscharakteristika ER-positiver und ER-negativer Tumorzellen unabhängig voneinander zu bestimmen. Um eine mögliche gegenseitige Beeinflussung beider Färbemethoden auszuschließen wurden Serienschnitte 10 invasiv duktaler Mammakarzinome entweder mit einer der einzelnen Methoden oder mit der Simultanfärbemethode ER/AgNORs gefärbt und nachfolgend vergleichend untersucht. Durch Vermessung der histologischen Schnitte mit Hilfe der digitalen Bildanalyse konnten reziproke Effekte ausgeschlossen werden. Es konnte nachgewiesen werden, daß die simultane Färbung beider Marker zu einem reproduzierbaren und spezifischen Färberesultat führt. Es ist somit gerechtfertigt, AgNORs in immunhistochemisch gefärbten Zellen zu messen.

Histologische Schnitte von 49 invasiven Mammakarzinomen wurden simultan für ER und AgNORs gefärbt. In jeweils 100 ER-positiven und ER-negativen Tumorzellkernen wurden die AgNORs mit Hilfe des Bildverarbeitungssystems AMBA vermessen. Zur Quantifizierung der AgNORs in immunhistochemisch gefärbten Zellkernen wurde das Programm AMBA\norcolor angewendet. Die AgNOR-Konfiguration wird beschrieben durch Anzahl, Fläche und räumliche Verteilung innerhalb des Zellkerns. Zwischen ER-positiven und ER-negativen Zellen bestehen hochsignifikante Unterschiede. ER-negative Zellen des Mammakarzinoms besitzen eine größere Anzahl AgNORs ($3,06 \pm 0,67$) verglichen mit den ER-positiven Zellen ($1,65 \pm 0,34$). Nur die AgNOR-Parameter der ER-negativen Zellfraktion korrelierten mit anderen Malignitätsmarkern (Bloom-Richardson-Grading; Wachstumsfraktion (Ki-67)). Die ER-negativen Zellen lassen sich als Zellfraktion mit höherer Proliferationsaktivität charakterisieren. Die Ergebnisse zeigen, daß die ER-negativen Zellen des Mammakarzinoms einen entscheidenden Beitrag zur Tumorerkrankung leisten und sehr wahrscheinlich die Progression der Tumorerkrankung bestimmen.

SCHLÜSSELWORTE: AgNORs, Estrogenrezeptoren, Mammakarzinom, Bildanalyse

SUMMARY

A new staining method for simultaneous demonstration of Estrogen receptors (ER) and argyrophilic Nucleolus-Organizer Regions (AgNORs) was developed to measure the proliferation characteristics of ER-positive and ER-negative tumour cell independently. To rule out possible reciprocal effects of the two staining procedures serial slides of 10 invasive ductal breast cancers were stained with either the single staining methods or the simultaneous ER/AgNOR-staining method and investigated comparatively. Measuring the slides by means of image analysis reciprocal effects could be excluded. It could be proved that a simultaneous staining of both markers leads to a reproducible and specific staining result. It is concluded that it is justified to measure AgNORs in immunohistochemically stained cells.

Specimens of 49 invasive breast cancers were stained simultaneously for Estrogen receptors (ER) and argyrophilic Nucleolus-Organizer Regions (AgNORs). AgNORs in 100 ER-positive and 100 ER-negative tumour cell nuclei were measured by means of the image analysis system AMBA. For the quantification of AgNORs within immunohistochemically stained nuclei the measuring program AMBA\norcolor was used. AgNOR number, area and distribution within the nucleus describe the AgNOR-configuration. Highly significant differences between ER-positive and ER-negative tumour cells were found. ER-negative breast cancer cells have a larger amount of AgNORs within their nuclei ($3,06 \pm 0,67$) compared to ER-positive cells ($1,65 \pm 0,34$). A special clustering phenomenon in ER-positive cells was found. Only the AgNOR-parameters of the ER-negative cell fraction were found to be associated with other indicators of malignancy (Bloom-Richardson-Grading; Growth-Fraction (Ki-67)). The ER-negative cells of breast cancer are characterised as the cell fraction with a higher proliferation activity. The results indicate that the ER-negative cells of breast cancer mainly contribute to the tumour proliferation characteristics and most likely to the progression of the tumour disease

KEY WORDS: AgNORs, Estrogen receptors, breast cancer, Image analysis

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	6
1.1	Prognosefaktoren beim Mammakarzinom	6
1.2	Nukleolus-organisierende Regionen (NORs)	9
1.3	Hormonrezeptorstatus	15
1.4	Zusammenhänge zwischen AgNOR-Ausstattung und Östrogenrezeptorstatus beim Mammakarzinom	21
2	AUFGABENSTELLUNG	22
3	MATERIAL UND METHODEN	24
3.1	Patientengut und Untersuchungsmaterial	24
3.2	Aufarbeitung des Materials	24
3.3	Die Simultanfärbung	25
3.3.1	Die Östrogenrezeptorfärbung - eine immunhistochemische Technik	25
3.3.2	Die AgNOR-Färbung - eine Versilberungstechnik	27
3.3.3	Das Färberegebnis	28
3.4	Meßmethodik	29
3.4.1	Das Bildverarbeitungssystem AMBA	29
3.4.2	Interaktive AgNOR-Vermessung mit dem Programm AMBA\color	30
3.4.3	Beschreibung der gemessenen AgNOR-Parameter	32
3.5	Statistik	34
4	ERGEBNISSE	35
4.1	Beeinflussung der Meßergebnisse durch die Simultanfärbung	35
4.1.1	Einfluß der Simultanfärbung auf die AgNOR-Darstellung	35
4.1.2	Einfluß der Simultanfärbung auf die Östrogenrezeptormarkierung	38
4.2	Unterschiede zwischen östrogen-positiven und östrogen-negativen Zellen hinsichtlich ihrer AgNOR-Ausstattung	41
4.2.1	AgNOR-Anzahl	42
4.2.2	AgNOR-Flächen	44
4.2.3	AgNOR-Lage	48
4.3	Das Verhalten der Variationskoeffizienten ausgewählter AgNOR-Merkmale	49
4.4	Beziehungen zwischen AgNOR-Ausstattung und Östrogenrezeptorstatus des Tumors	50
4.5	Beziehungen zwischen AgNOR-Merkmalen und anderen Malignitätskriterien	51

5	DISKUSSION	55
5.1	Stellenwert von AgNORs und Östrogenrezeptorstatus	55
5.2	Material und Färbetechnik	56
5.3	Meßmethodik	58
5.4	Gegenseitige Beeinflussung der Färbemethoden	59
5.5	Unterschiede zwischen östrogen-positiven und östrogen-negativen Zellen	61
5.6	Beziehungen zwischen Östrogenrezeptoren und Wachstumsfraktion beim Mammakarzinom	64
5.7	Schlußfolgerungen und Konsequenzen für die AgNOR-Vermessung beim Mammakarzinom	65
6	ZUSAMENFASSUNG	67
7	LITERATURVERZEICHNIS	70
8	ANHANG	82

1 EINLEITUNG

1.1 PROGNOSEFAKTOREN BEIM MAMMAKARZINOM

Das Mammakarzinom ist das häufigste Malignom der Frauen in der westlichen Welt und nach wie vor Gegenstand intensiver Forschung.

In den USA sind 32% aller bei Frauen auftretenden malignen Neoplasien Mammakarzinome, gefolgt vom kolorektalen Karzinom mit nur 14% [SILVERBERG et al. 1990]. In der Altersgruppe der fünfundzwanzig- bis vierunddreißigjährigen Frauen in den Vereinigten Staaten ist der Brustkrebs die häufigste Ursache eines Versterbens durch eine Krankheit, in der Gruppe der fünfunddreißig- bis vierundfünfzigjährigen Frauen sogar die häufigste Einzeltodesursache [SILVERBERG et al. 1990].

In den letzten Jahrzehnten ist ein weiterer Anstieg der Inzidenz zu verzeichnen [WHITE et al. 1987]. So betrug die jährliche Anstiegsrate zwischen 1980 und 1985 im statistischen Mittel 3%. Für einen erst kürzlich zu verzeichnenden Inzidenzanstieg wird weitgehend die erweiterte Anwendung von Screeningmethoden verantwortlich gemacht [MASOOD et al. 1992].

Definiert man den Begriff „**Prognosefaktor**“ als Tumor- oder Wirtsfaktor, welcher präzise Aussagen über den individuellen Verlauf und Ausgang der Erkrankung macht, gibt es auch beim Mammakarzinom bis heute keinen solchen Parameter.

Dennoch existieren eine Anzahl von Variablen, die in ihrer Gesamtheit helfen, die Patientin hinsichtlich ihres relativen Rezidivrisikos einzuordnen. Mit diesen Faktoren wird versucht, den Tumordifferenzierungsgrad, die Proliferation, die Invasivität sowie das metastatische Potential abzuschätzen. Weiterhin ist man bemüht, die Sensibilität oder Resistenz des Tumors gegenüber einer geplanten Behandlung zu bestimmen.

Eine genauere Bewertung wird jedoch erschwert, wenn aussagekräftige Prognosedaten entfallen, zum Beispiel wenn ein negativer axillärer Lymphknotenstatus vorliegt. Ein besonderes Anliegen ist somit nach wie vor die Klassifikation insbesondere von Patientinnen mit metastasenfremen axillären Lymphknoten.

Durch die Fortschritte sowohl in den medizinisch-biologischen Wissenschaften als auch in der Computertechnologie traten in den letzten Jahren zu den „klassischen“ auch neue „experimentelle“ Prognoseindizes. Die Anwendbarkeit und Aussagekraft dieser experimentellen Merkmale müssen erst durch weitere Experimente unter Beweis gestellt werden.

Zu einem Schwerpunkt in der Forschung wurde neben der Suche nach weiteren Kriterien auch die Erhöhung der Effizienz der bestehenden Parameter, zum Beispiel durch Verbesserungen in der Methodik. Das Ziel dieser Forschung liegt nicht nur in einer besseren Voraussage des Krankheitsverlaufes. Es sollten gleichzeitig auch therapeutische Entscheidungen erleichtert werden.

Besonders einfach zugänglich sind Daten über das **Alter** der Patientinnen sowie den **Menopausenstatus**. Als allgemein anerkannt gilt, daß ein relativ hoher Prozentsatz der jungen bis sehr jungen Patientinnen mit einem aggressiven Krankheitsverlauf rechnen

muß. Weitaus umstrittener ist die Aussage, daß bei älteren Patientinnen oft ein im Hinblick auf die Prognose günstigerer Verlauf zu beobachten ist. Eine schwedische Langzeitstudie beobachtete hingegen die schlechtesten Prognosen bei sowohl sehr jungen als auch älteren Patientinnen [ADAMI et al. 1986].

Der **axilläre Lymphknotenstatus** ist nach wie vor der aussagekräftigste prognostische Faktor, denn das Rezidivrisiko steigt kontinuierlich mit der Anzahl der positiven Lymphknoten an [NEMOTO et al. 1980].

Ein negativer axillärer Lymphknotenstatus liegt bei ungefähr zwei Drittel der Brustkrebsfälle vor [McGUIRE et al. 1992]. In dieser Patientengruppe ist eine Auswahl der Patientinnen zu treffen, die eine so gute Prognose haben, daß die toxischen Auswirkungen einer Strahlen- oder Chemotherapie vermieden werden können. Das sind ungefähr 70% der Patientinnen mit negativem Lymphknotenbefund [McGUIRE et al. 1992].

Andererseits sind solche Patientinnen zu identifizieren, die trotz eines negativen Lymphknotenstatus einer aggressiven adjuvanten Therapie zugeführt werden müssen. Zusätzlich lassen sich die größte Metastase sowie die Invasion der Lymphknotenkapsel beurteilen. Ein negativer Lymphknotenstatus deutet jedoch nicht zwangsläufig auf eine gute Prognose hin, denn 25 bis 30% dieser Patientinnen erleben ein Rezidiv, wenn keine adjuvante Therapie durchgeführt wird.

Die **Tumorgroße** korreliert mit dem Rezidivrisiko sowohl bei positivem als auch negativem Lymphknotenstatus. Bei einer Tumorgroße von weniger als einem Zentimeter und metastasenfreien Lymphknoten liegt die Fünfjahresüberlebensrate bei 98%, was als exzellente Prognose einzuschätzen ist [CARTER et al. 1989].

Verschiedene **histologische Variablen** werden beschrieben und haben seit langem Einzug in die tägliche klinische Praxis gehalten. Dieses sind die histopathologischen Standardparameter. Dazu gehören der **histologische Tumortyp** entsprechend der WHO-Klassifikation [WHO 1982], das **histopathologische Grading** nach BLOOM und RICHARDSON [BLOOM et al. 1957 und 1962], das **Kerngrading** nach BLACK und ASIRE [BLACK et al. 1957] sowie Begleitfaktoren wie Lymph-, Blutgefäß- und perineurale Infiltration und auch Tumornekrose. Ebenfalls sind quantitative Parameter verfügbar wie zum Beispiel der Zellularitätsindex, Kernmaße oder die Kern-Plasma-Relation. Die Bestimmung dieser Parameter ist sowohl „klassisch“ am Mikroskop als auch mit Hilfe eines Bildanalyse-Systems möglich [HUFNAGL et al. 1989; GUSKI et al. 1990].

Grundsätzlich gilt natürlich, daß ein hoher Differenzierungsgrad mit einer besseren Prognose korreliert. Dennoch wird die Validität solcher Indizes eingeschränkt durch die Subjektivität der Beurteilung durch den Histologen und die Retrospektivität vieler Studien. Das histopathologische Grading und das Kerngrading haben vor allem bei Patientinnen mit negativem Lymphknotenstatus eine besondere prognostische Relevanz [FISHER et al. 1984; ROSEN et al. 1989].

Auf die diagnostische Aussagekraft und prognostische Signifikanz des **Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus** beim Mammakarzinom wird weiter unten eingegangen.

Proliferationsindizes sind relativ neue experimentelle Prognosefaktoren und scheinen besonders bei Patientinnen mit metastasenfreien axillären Lymphknoten von Bedeutung zu sein. Ein Tumor mit niedriger Proliferationstendenz deutet auf ein niedriges Rezidivrisiko.

Der **Mitoseindex** ist Bestandteil des BLOOM-RICHARDSON-Gradings und bestimmt die Anzahl der Mitosen innerhalb des Tumors in zehn mikroskopischen Gesichtsfeldern. Ein Parameter, der in großen Tumorzentren heute standardmäßig bestimmt wird, ist die **Wachstumsfraktion** (Ki-67) des Tumors. Diese läßt sich mit Hilfe des paraffin-gängigen Antikörpers MIB 1 darstellen.

Eine andere wichtige Methode zur Abschätzung der Proliferationsaktivität des Tumors ist die Analyse der **AgNORs**. Nukleolus-organisierende Regionen (NORs) sind Kernproteine, welche mit ribosomalen Genen in Verbindung stehen. Ihre Analyse und prognostische Aussagekraft wird weiter unten ausführlich diskutiert.

Andere Proliferationsmarker sind zum Beispiel der **DNA-Gehalt**, der **Thymidin-Markierungs-Index**, die **S-Phase-Fraktion** sowie das Proliferationsantigen **PCNA** [MARTIN 1994].

Abschließend sollen noch einige Parameter aufgeführt werden, deren prognostische Prädiktivität noch weitgehend umstritten ist.

Hier wäre das **HER-2** (c-erb B-2 oder *neu*) **Onkogen** zu nennen, welches einen membranständigen Wachstumsfaktor-Rezeptor kodiert [SCHECHTER et al. 1984]. Generell wurde festgestellt, daß die Amplifikation des HER-2-Onkogens mit fortgeschrittenem Krankheitsstadium sowie schlechterer Prognose korreliert [SLAMON et al. 1987; VARLEY et al. 1987]. Der allgemeine prognostische Wert ist weiterhin unklar, scheint aber sinnvoll bei Patientinnen mit positivem axillären Lymphknoten-status zu sein [SLAMON et al. 1987].

Ein anderer putativer Prognoseindex ist der Membranrezeptor für den Epidermal Growth Factor (**EGF-R**) [SAINSBURY et al. 1985]. Das EGF-R-Gen steht in enger Verbindung zum HER-2 Onkogen. Der EGF-R wird in Tumoren mit hoher biologischer Aggressivität exprimiert und steht in inverser Korrelation zur Östrogenrezeptorexpression [RIOS et al. 1988]. Hohe Werte deuten auf ein kurzes rezidivfreies Intervall [SAINSBURY et al. 1988].

Weiterhin wurden vier östrogenregulierte Proteine, die in Zellen des Mammakarzinoms exprimiert werden, identifiziert.

Cathepsin D ist eine lysosomale Protease, die in den meisten östrogen-positiven Brustkrebszellen überexprimiert und abnorm sezerniert wird. Verschiedene Studien diskutieren Cathepsin D als einen unabhängigen prognostischen Faktor, der ein erhöhtes Risiko für Rezidive und Fernmetastasen anzeigt [THORPE et al. 1989; SPYRATOS et al. 1989].

Andere Schlüsse sind aus der Expression eines weiteren östrogenregulierten Proteins, des **pS2** zu ziehen. Sein Nachweis ist verbunden mit längerer Gesamtüberlebenszeit sowie mit längerem krankheitsfreiem Intervall [RIO et al. 1990]. In der Gruppe der Patientinnen mit negativem Östrogenrezeptorstatus kann ein positiver pS2-Nachweis auf eine bessere Prognose hinweisen, im Vergleich zu pS2-negativen Fällen [HURLIMANN et al. 1993].

Das Hitzeschockprotein **HSP 27** läßt sich sowohl biochemisch mit einem ELISA [ADAMS et al. 1985] als auch immunhistochemisch bestimmen [CIOCCA et al. 1990]. Es korreliert nicht mit der Ansprechrate auf eine endokrine Therapie, kann aber wie das pS2 bei Fällen ohne Östrogenrezeptoren diejenigen auswählen, die eine bessere Prognose haben [HURLIMANN et al. 1993].

Weiterhin scheint eine Assoziation zwischen dem Östrogenrezeptor und dem **ER D5**-Zytosolprotein zu bestehen [KING et al. 1985]. Es konnte jedoch keine prognostische Relevanz nachgewiesen werden [HURLIMANN et al. 1993].

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß keiner der beschriebenen experimentellen Prognosefaktoren Eingang in die Routinediagnostik gefunden hat. Hierzu fehlen entsprechende Multicenterstudien. Diese werden aus Kosten- und Praktikabilitätsgründen auch in Zukunft nur für einen kleinen Teil der angegebenen Marker durchgeführt werden können.

Somit gelten nach wie vor nur das Staging entsprechend der pTNM-Klassifikation, das Grading nach BLOOM und RICHARDSON sowie der Hormonrezeptorstatus als valide und routinetaugliche Prognosefaktoren.

1.2 NUKLEOLUS-ORGANISIERENDE REGIONEN (NORs)

Struktur und Funktion der NORs

Der Begriff „Nukleolus-organisierende Regionen“ (NORs) geht auf HEITZ zurück, welcher Zellzyklusanalysen an Pflanzenzellen unternahm [HEITZ et al. 1931]. FERGUSON-SMITH konnte dreißig Jahre später das gleiche Phänomen an menschlichen Zellen beobachten [FERGUSON-SMITH et al. 1964].

Nach heutigem Verständnis handelt es sich bei NORs um **Schleifen ribosomaler DNA (rDNA)**. Diese rDNA befindet sich auf den Satelliten der akrozentrischen Chromosomen (Gruppe D: 13-15; Gruppe G: 21, 22). Diese Satelliten assoziieren sich und werden während der Interphase Teil des Nukleolus. Die NORs selbst sind punktförmige Substrukturen des Nukleolus der Interphasenzelle.

Der Nukleolus zeigt eine typische Ultrastruktur mit netzartig angeordnetem, teils granulärem, teils fibrillärem Material, welches sich in drei Kompartments unterteilen läßt:

1. fibrillar centers (FC)
2. dense fibrillar component (DFC)
3. granular component (GC)

Die NORs befinden sich während der Interphase innerhalb der FC und DFC.

Die rDNA dieser Genorte codiert für rRNA und hat somit eine Schlüsselfunktion bei der Ribosomensynthese und Zellproteinsynthese. Nach FAKAN werden NORs auch als „Ribosomenfabriken“ bezeichnet [FAKAN et al. 1986].

Bei verschiedenen malignen Tumoren stehen die visualisierten NORs in enger Beziehung zu Tumorproliferationsraten, Zellverdopplungszeiten, zur Zelldifferenzierung und zur Prognose des Patienten [DERENZINI et al. 1989b und 1990; REEVES et al. 1984; AUBELE et al. 1994a]. Damit sind NORs als putative Prognoseindikatoren bei malignen Tumoren aufzufassen.

Der histologische Nachweis von NORs ist relativ einfach durchzuführen. Jedoch existieren eine Reihe von Faktoren, welche sowohl die Darstellung als auch die Quantifizierung beeinflussen können.

Der Anspruch an die Forschung besteht in der Entwicklung einer reproduzierbaren Färbe-, Meß- und Auswertungsmethode und der Verifizierung der prognostischen Signifikanz für die einzelnen Organtumoren.

Nachweismethoden für NORs

RUZICKA beschrieb 1899 erstmals das Phänomen der Silberanfärbbarkeit der Nukleoli. Die ersten Untersuchungen an NORs wurden durch direkte **Mikroskopie** von Chromosomen in der Metaphase durchgeführt [HEITZ et al. 1931; FERGUSON-SMITH et al. 1964]. Später gelang es, NORs durch **in-situ Hybridisierung** mit markierter rRNA oder cDNA darzustellen [EVANS et al. 1974; HSU et al. 1975]. Ebenfalls konnten ultrastrukturelle Untersuchungen mit Hilfe der **Elektronenmikroskopie** durchgeführt werden [HERNANDEZ-VERDUN et al. 1979].

Grundlage der Betrachtungen bezüglich pathologischer Tumordiagnostik ist jedoch die Visualisierung der NORs durch eine **Versilberungstechnik**.

GOODPASTURE und BLOOM leisteten auf diesem Gebiet Pionierarbeit und stellten 1975 eine Drei-Schritt-Färbemethode vor [GOODPASTURE et al. 1975], welche durch HOWELL und BLACK auf einen Schritt reduziert werden konnte [HOWELL et al. 1980]. Ein weiterer Durchbruch gelang PLOTON, welcher die Ein-Schritt-Methode so modifizierte, daß sie an Paraffinschnitten und bei Raumtemperatur angewendet werden konnte [PLOTON et al. 1986].

Die so dargestellten NORs nennt man **AgNORs**. Die klare Unterscheidung zwischen den Begriffen NOR und AgNOR ist zu beachten. Das AgNOR ist das visualisierte (versilberte) NOR, also ein **Artefakt**. Hinzu kommt, daß durch die Versilberung nicht alle NORs angefärbt werden [VARLEY 1977].

Das verwendete Silber bindet zwar spezifisch an die NOR-Region, jedoch nicht an die rDNA selbst, sondern an mit ihr verbundene saure Regulatorproteine, sogenannte **NORAPs** (NOR associated proteins) [GOODPASTURE et al. 1975]. Es zeigte sich jedoch, daß in verschiedenen Phasen des Zellzyklus nicht immer die gleichen NORAPs an der AgNOR-Färbung beteiligt sind (siehe Tabelle 1) [ROUSSEL et al. 1994].

Tab. 1: Haupt-AgNOR-Proteine während Mitose und Interphase
(nach ROUSSEL et al. 1994)

Mitose	Interphase
RNA-Polymerase I-subunit	Nucleolin C 23
135 kDa-NOR-Protein	Protein B 23
UBF-Transkriptionsfaktor	42 kDa-Protein
50 kDa-Protein	40 kDa-Protein
	29 kDa-Protein

Die eigentliche Versilberungsreaktion verläuft in enger Anlehnung an den fotografischen Grundprozeß in zwei theoretischen Phasen: der Imprägnierungsphase und der Entwicklungsphase. Zuerst erfolgt die Imprägnierung des Zellmaterials mit Silbernitrat und nachfolgender spezifischer Bindung der Silberionen an die oben genannten argyrophilen Non-Histon-Proteine. Die Entwicklung des bis jetzt latenten

Bildes erfolgt durch Zugabe eines Reduktionsmittels (zum Beispiel Ameisensäure), welches das ionische Silber in atomares Silber überführt und somit zum sichtbaren Silberniederschlag führt. Bei der heute angewandten Ein-Schritt-Methode können beide Schritte simultan ablaufen.

Quantifizierung der AgNORs

Die Zählmethode

Die einfachste Form der Quantifizierung von AgNORs ist die direkte Zählung der AgNOR-dots pro Nukleus mit dem Auge des Untersuchers am Mikroskop [CROCKER et al. 1989].

Die Methode bleibt jedoch auf Fälle beschränkt, die eine distinkte Anfärbung der Einzeldots aufweisen. Ebenfalls dürfen keine Clusterungs-Phänomene auftreten. Die Zählung der für das Auge winzigen Einzeldots unter dem Lichtmikroskop unterliegt einem stark subjektiven Einfluß und führt zu einer baldigen Ermüdung des Untersuchers [GIRI et al. 1989].

Allerdings ist diese Herangehensweise trotz ihrer Zeitaufwendigkeit überaus einfach durchführbar und an keinen großen apparativen Aufwand geknüpft.

Die digitale Bildanalyse

Die Anwendung der computergestützten digitalen Bildanalyse zur Quantifizierung der AgNORs wurde 1989 erstmals vorgestellt und gilt heute als **Methode der Wahl** [DERENZINI et al. 1989a; RÜSCHOFF et al. 1989; MARTIN et al. 1991].

AgNOR-dots verschiedener Zellen unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich ihrer Anzahl, sondern auch hinsichtlich ihrer Größe, Verteilung und Intensität [FIELD et al. 1984]. Diese Parameter lassen sich natürlich nicht durch das Auge des Untersuchers evaluieren.

Mit Hilfe eines Bildverarbeitungssystems ist es möglich, sowohl Zellkerne als auch die in den Kernen liegenden AgNORs zu segmentieren, zu zählen und zu vermessen. Diese Analysen zeichnen sich durch hohe Präzision und Reproduzierbarkeit aus [HUFNAGL et al. 1989].

Histometrische Kenngrößen zur Quantifizierung von AgNORs beschreiben Anzahl, Größe und räumliche Verteilung der AgNORs im Zellkern [HUFNAGL et al. 1994].

Störgrößen der Quantifizierung

Die Clusterbildung

Als Clusterbildung bezeichnet man das Verschmelzen von Einzeldots zu AgNOR-Aggregaten, sogenannten Clustern.

Dieses Phänomen hat sowohl **biologische** als auch **methodische Ursachen**:

1. AgNORs in hochdifferenzierten **Zellen** neigen besonders zur Clusterbildung. Eine Ursache dafür scheint zu sein, daß die Einzel-NORs schon vor dem Färbeprozess

eingebettet in einer nur elektronenmikroskopisch sichtbaren Proteinmatrix dicht beieinander liegen [PLOTON et al. 1994]. So untersuchten RÜSCHOFF et al. 1994 verschiedene Urothelzelllinien und beobachteten große Clusterbildungen nahezu ausschließlich in hochdifferenzierten Zelllinien. Daraus schlußfolgerte man, daß große Clusterbildung ($>6\mu\text{m}\varnothing$) ein Ausdruck der Zelldifferenzierung ist.

2. Durch den **Färbeprozess** selbst lagern sich die Silberionen räumlich um die argyrophilen NOR-Proteine und führen somit zu einem Verwischungseffekt und „Ineinanderfließen“ von Einzel-NORs.
3. Auch die Stärke der **optischen Vergrößerung** bei späterer Betrachtung übt einen nicht unerheblichen Einfluß aus. So zeigen sich bei niedriger Auflösung AgNOR-Aggregate, welche sich bei höherer Auflösung noch trennen lassen. Dieses Phänomen wird durch die Abtastung des Mikroskopbildes mit einer Videokamera noch verstärkt.

Die Clusterung führt als Summationseffekt der drei beschriebenen Grundprozesse zu einem meßtechnischen **Überschätzen der wahren AgNOR-Summenfläche**. Es sind weitere Quantifizierungsmerkmale notwendig, welche die AgNOR-Cluster beschreiben können. Diese beinhalten in Analogie zum Einzel-AgNOR Anzahl-, Flächen- und Lageparameter [HUFNAGL et al. 1994].

Überlappung und Materialverlust

Obwohl man AgNORs am Mikroskop immer in einer Ebene betrachtet, sind diese eigentlich räumliche, daß heißt dreidimensionale Strukturen.

So gelangt bei der **zytologischen Präparation** die gesamte Menge der AgNORs in die Ebene des Objektträgers. Durch dieses „Hinabsinken“ überlappen die Einzeldots häufig und lassen sich schwer diskriminieren.

Andererseits werden durch das Herstellen **histologischer Schnitte** mit dem Mikrotom bei den üblichen Schnittdicken um $3\mu\text{m}$ nie gesamte Zellkerne präsentiert, sondern nur deren Anschnitte oder scheibenförmige Durchschnitte. Der dadurch offensichtliche Materialverlust kann nach Schätzungen von RÜSCHOFF et al. 1994 bis zu 50% der AgNOR-Gesamtmenge betragen und führt zu einem nicht unerheblichen Meßfehler. Eine Möglichkeit, diesen Materialverlust auszugleichen, sah man in einer Anfärbung des gesamten Nukleolus und dessen Vermessung bei niedriger Vergrößerung [TRERÈ et al. 1994].

Die Notwendigkeit der Standardisierung in Präanalytik, Färbeprozess und Quantifizierung

Da verschiedene Methoden der Fixierung, Präparation und Färbung der Gewebeproben existieren und auch unterschiedliche Quantifizierungsmöglichkeiten bestehen, sind:

1. die Meßergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen nicht miteinander vergleichbar.
2. Schlußfolgerungen aus numerischen Ergebnissen kaum möglich.

Diese Problematik führte 1993 an der Berliner Charité zur Gründung des „International Committee on AgNOR-Quantitation“. Diese Arbeitsgruppe diskutierte die Möglichkeiten einer Standardisierung des gesamten Färbe- und Auswertungsprozesses und

veröffentlichte erste Richtlinien [AUBELE et al. 1994b], welche ein Jahr später weiter konkretisiert wurden [ÖFNER et al. 1995a].

Tabelle 2 zeigt eine Reihe von Einflußfaktoren, welche das Färbeergebnis und damit auch das Meßergebnis beeinflussen. Daraus wird ersichtlich, daß ohne ein einheitliches, standardisiertes Färbeprotokoll Diskussionen über reproduzierbare Meßwerterfassung und -verarbeitung hinfällig sind.

Tab. 2: Einflußfaktoren auf das AgNOR-Färbeergebnis.
(modifiziert nach RÜSCHOFF 1992)

Einflußfaktoren	AgNOR-Färbung	
	verstärkt	vermindert
1. Fixierung Art Beginn Dauer	Alkohole sofort <12h	Schwermetalle verzögert >12h
2. Präparation Schnittdicke	3-5µm	>5µm→unscharf
3. Versilberung Inkubation Temperatur Glasgefäße Gelatine	verlängert erhöht	verkürzt verringert unsauber überaltert

Zur **Standardisierung des Meßprozesses** sind weitere Überlegungen notwendig.

Bei **Anzahlmessungen** erweist sich die Clusterbildung als Problem, welche die „wahre“ Anzahl von AgNOR-dots zu niedrig erscheinen läßt. Zur Minimierung dieses Fehlers kann man zusätzlich zu den Anzahl- und Flächenmessungen eine Clusteranalyse durchführen.

Bei **Flächenmessungen** von AgNORs läßt sich als Bezugsgröße die Fläche des umgebenden Zellkerns verwenden. Die zentrale Frage hier ist die unterschiedliche Argyrophilie von Gewebeproben [RÜSCHOFF 1992]. Einerseits ist die optimale Färbezeit vom Organtyp selbst abhängig, andererseits sind bei Untersuchungen an Archivmaterial die Präparations- und Fixierungsschemata und ihre Kompatibilität mit modernen Anforderungen an AgNOR-Material nicht mehr veränderbar und oft auch nicht direkt nachvollziehbar.

Es existieren heute zwei Ansätze zur **Standardisierung von Flächenmessungen**.

Da die Größe der AgNORs von **Lymphozyten** unterschiedlicher Gewebeproben relativ konstant ist, spiegelt die AgNOR-Größe in autochthonen Lymphozyten des zu untersuchenden Gewebes letztendlich die Argyrophilie der Probe wider und korreliert außerdem mit der optimalen Färbezeit [RÜSCHOFF 1992]. Es läßt sich also aus der AgNOR-Größe beliebiger Lymphozyten im histologischen Schnitt schlußfolgern, ob und in welchem Maße die AgNORs des zu untersuchenden Gewebes über- oder unterfärbt sind. Allerdings hat die Auswahl der Lymphozyten einen beträchtlichen Einfluß auf die Bestimmung des Index, der als der Quotient von mittlerer AgNOR-

Fläche pro Zellkern und der mittleren AgNOR-Summenfläche der Lymphozyten bestimmt wird. Damit ist die Lymphozytenkorrektur auch eine mögliche Fehlerquelle.

Eine weitere Methode ist die **Flächenmessung des gesamten Nukleolus**. Durch Verlängerung der Färbezeiten bei der Versilberungsreaktion dehnt sich die Färbung von den AgNOR-dots auf den gesamten Nukleolus aus. Die Fläche des Nukleolus steht in enger Korrelation zur Gesamtfläche aller AgNORs im Zellkern unabhängig von der spezifischen Argyrophilie des Gewebes [TRERÈ 1994].

Relativ neue Parameter bei der Beurteilung der AgNOR-Ausstattung von Zellen sind die **Variationskoeffizienten** der AgNOR-Fläche sowie der AgNOR-Anzahl. Einerseits sind diese Variationskoeffizienten ein Schritt in Richtung Standardisierung. Sie sind relativ unabhängig von den beschriebenen Einflußfaktoren und Störgrößen und bieten einen Einblick in die „inter- und intra-Untersucher-Reproduzierbarkeit“ der Methode selbst [ÖFNER et al. 1995c]. Andererseits wird jedoch die biologische Aussagekraft dieser Parameter bis heute nicht genau verstanden. Der Variationskoeffizient der AgNOR-Anzahl reflektiert wahrscheinlich eher verschiedene AgNOR-Verteilungsmuster als AgNOR-Quantitäten [ÖFNER et al. 1995b].

Leider existieren bis heute kaum Veröffentlichungen, welche sich systematisch mit der Standardisierung der meßtechnischen Erfassung und Verarbeitung von AgNOR-Meßdaten beschäftigen.

Diagnostische Aussagekraft von AgNOR-Parametern

Grundsätzlich geben AgNOR-Parameter Auskunft über **Zellaktivität**. Die Argyrophilie der den NORs assoziierten sauren Regulatorproteine (NORAPs) ist dabei direktes Kennzeichen des Aktivierungszustandes der ribosomalen DNA (rDNA).

Die ersten quantitativen Ergebnisse stellten BUSCH et al. 1970 vor. Hier wurde ein enger Zusammenhang zwischen AgNOR-Menge und **Syntheseraten an rRNA** nachgewiesen.

Ebenfalls konnten Korrelationen zwischen AgNOR-Quantität und **maligner Transformation** bei mit Diethylnitrosamin (DEN) stimulierten Rattenleberzellen nachgewiesen werden [DELEENER et al. 1987].

REEVES et al. zeigten 1984 Beziehungen zur **Zelldifferenzierung**. In entdifferenzierten Zellen fanden sich eine höhere Anzahl kleinerer AgNORs im Vergleich zu Zellen höheren Differenzierungsgrades. Wird die AgNOR-Anzahl isoliert betrachtet, zeigt sich aber eine ungenügende diagnostische Trennschärfe zwischen benignen und malignen Brusttumoren [SMITH et al. 1988].

Ein besonderer Durchbruch gelang DERENZINI et al. 1989b und 1990 mit dem Nachweis einer engen Korrelation zwischen AgNOR-Anzahl und AgNOR-Gesamtfläche einerseits und **Tumorproliferationsraten** andererseits. Diese Ergebnisse wurden zuerst an Neuroblastomzelllinien erzielt und später an Zellkulturen des Mammakarzinoms und elf anderen Organtumoren eingestellt.

Prognostische Bedeutung von AgNOR-Parametern beim Mammakarzinom

In einer sehr umfangreichen Studie von AUBELE et al. 1994a wurden AgNOR- und DNA-Daten hinsichtlich ihrer Prognoserelevanz untersucht. Besonders aussagekräftige Parameter hinsichtlich der Prognose sind demnach die **Variationskoeffizienten** sowohl der relativen AgNOR-Fläche als auch der AgNOR-Anzahl. Nachfolgend wurde die Validität der AgNOR-Marker im Vergleich zu klinisch-histologischen Daten und DNA-Parametern mit Hilfe einer multivariaten Cox-Regressionsanalyse untersucht. Danach rangiert der Variationskoeffizient der relativen AgNOR-Fläche an dritter Stelle hinter der Standardabweichung der DNA-Verteilung und dem pTNM-Stadium hinsichtlich der Überlebenszeit und dem metastasenfreien Intervall.

Nach BOCKMÜHL et al. 1991 ist die AgNOR-Anzahl ein Marker des **metastatischen Potentials** des Tumors. Es fanden sich signifikante Unterschiede der AgNOR-Anzahl zwischen Patientinnen mit und ohne Lymphknotenmetastasen

1.3 HORMONREZEPTORSTATUS

Struktur und Funktion von Hormonrezeptoren

Der Hormonrezeptorstatus beim Mammakarzinom gehört schon zu den „klassischen“ Prognosefaktoren. Assays für sowohl Östrogenrezeptoren (engl.: ER) als auch Progesteronrezeptoren (PR) sind heute Standardmethoden im Diagnostikregime bei Patientinnen mit Brustkrebs.

Hormonrezeptoren sind hochmolekulare Proteine. Eine Abgrenzung gegenüber anderen unspezifisch bindenden Proteinen wie Albumin, Transcortin und Sexualhormon-bindendem-Protein ist durch spezifische Eigenschaften der Hormonrezeptoren möglich. Dazu gehören hohe Spezifität, niedrige Anzahl von Bindungsstellen mit hoher Affinität, jedoch niedriger Kapazität [KLINGA et al. 1984].

Östrogen induziert in den mit entsprechenden Rezeptoren ausgestatteten Karzinomzellen Proteine, welche Prozesse regulieren, die zu einer Zellteilung führen [LIPPMAN et al. 1975; LYKKESFELD et al. 1986].

Ein **klassisches Modell** für den zellulären Wirkungsmechanismus der Östrogen- und Progesteronrezeptoren gemäß dem allgemeinen Modell der Steroidrezeptoren existierte seit langem. Danach diffundiert das Steroidhormon durch die Membran der Zellen des Zielgewebes. Im zytoplasmatischen Raum bindet es an sein spezifisches Rezeptorprotein, was eine Transformation zu einem Hormon-Rezeptor-Komplex nach sich zieht. Nach einer Translokation des Komplexes in den Zellkern erfolgt eine spezifische Bindung an bestimmte Chromatinregionen, sogenannten Promotorregionen, die nach eigener Aktivierung die Tätigkeit einer RNA-Polymerase einleiten. Das führt über die Synthese einer messenger-RNA zur Synthese von DNA und spezifischen Proteinen [JENSEN et al. 1973].

Nach diesen Vorstellungen befinden sich alle Rezeptoren primär im Zytosol. Deshalb überraschte die Tatsache, daß nach Anwendung hochspezifischer Detektoren wie monoklonaler Antikörper gegen die Rezeptorproteine im Gewebsschnitt fast ausschließlich die Kerne gefärbt wurden und nicht wie erwartet das Zytosol.

Die Weiterentwicklung der klassischen Vorstellungen über die Rezeptorlokalisierung führte zu einem **modernen Rezeptormodell**. Dabei wird an den primären Wirkungen des Hormon-Rezeptor-Komplexes auf die Promotorregionen nicht gezweifelt.

1. Nach diesen modernen Vorstellungen sind alle Östrogen- und Progesteronrezeptoren, daß heißt sowohl freie als auch hormonegebundene Rezeptorproteine primär im Zellkern lokalisiert.
2. Rezeptoren, die in Zytosolpräparationen nachgewiesen werden, wie zum Beispiel bei der DCC-Methode oder dem konventionellen Enzym-Immuno-Assay, werden nicht als Funktionsentität sondern als Präparationsartefakt betrachtet [MARTIN et al. 1982, KING et al. 1984].
3. Die ehemals postulierte Translokation des Hormon-Rezeptor-Komplexes in den Zellkern wird heute als allosterisch vermittelte Veränderung der Bindungsstärke des Komplexes mit spezifischen Kernelementen angesehen. Die Zunahme dieser Bindungsstärke ist wahrscheinlich Folge hormoninduzierter allosterischer Rezeptoraktivierung, durch welche die Interaktion mit den Zielgenen vermittelt wird.
4. Auf der einen Seite steht eine „**zytosolische**“ **Fraktion** nicht aktivierter, das heißt freier Rezeptoren, welche nur eine lose Verbindung mit Kernbestandteilen eingeht und sich somit leicht mit Salzpuffern niedriger Ionenstärke extrahieren läßt. Diese Fraktion ist es auch, welche mit biochemischen Techniken, wie zum Beispiel der DCC-Methode oder dem konventionellen EIA nachgewiesen wird. Bei beiden Methoden werden die homogenisierten Gewebeproben in einen Puffer überführt, welcher die leicht extrahierbaren Rezeptoren aus den Kernen herauslöst. Diese „zytosolischen“ Rezeptoren sind also als Artefakte der Präparationstechnik anzusehen.
5. Andererseits existiert eine „**nukleäre**“ **Fraktion** aktivierter, hormonegebundener Rezeptoren, die eine stärkere Bindung an Kernkomponenten aufweist und für deren Extraktion Puffer mit größerer Ionenstärke notwendig sind [MARTIN et al. 1982]. Diese Rezeptorfraktion läßt sich ebenfalls biochemisch quantifizieren. Für dieses spezielle Enzym-Immuno-Assay sind jedoch Kernpräparationen notwendig [THORPE et al. 1987].

Durch moderne molekulargenetische Methoden wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) konnten in Brustkrebszellen verschiedene **Varianten** des Östrogenrezeptor-Wildtyps identifiziert werden [LEMIEUX et al. 1996].

1. Eine „**Exon 5-Deletionsvariante**“ wurde aus östrogen-negativen Mammatumorzellen extrahiert. Obwohl diese Variante unfähig ist, Östrogen zu binden, da sie keine hormonbindende Domäne besitzt, stimuliert sie die Transkription und kann so die Expression anderer Gene zum Beispiel der des Progesteronrezeptors steuern. Es wird postuliert, daß dieser Rezeptorform Bedeutung bei der Tumorprogression und bei der Resistenz gegen antiöstrogene Therapie zukommt.
2. Die andere Variante wird als „**hypersensitive Rezeptorvariante**“ bezeichnet. Sie weist nur eine Punktmutation auf, welche keine Alteration der Affinität zu Östrogen oder DNA bedingt. Jedoch zeigt sich eine Hypersensitivität gegenüber subphysiologischen Östradiol-Konzentrationen. Nach einer weiteren Hypothese von LEMIEUX et al. 1996 könnte dies eines der frühesten Ereignisse sein, welches zu einer erhöhten Zellproliferation im noch nicht erkrankten Mammagewebe führt.

Die **Beziehungen zwischen Östrogen- und Progesteronrezeptoren** auf zellulärer Ebene sind vielfältig. Es ist zu unterstreichen, daß durch Wirkung des Östrogen-Rezeptor-Komplexes im Zellkern eine Induktion sowohl neuer Östrogenrezeptoren als auch neuer Progesteronrezeptoren erfolgt [HORWITZ et al. 1977 und 1978; THORPE et al. 1987]. Das bedeutet, daß die Synthese von Progesteronrezeptoren auch durch die

Östrogenwirkung kontrolliert wird. Jedoch läuft in einigen Zellklonen die Synthese der Progesteronrezeptoren unabhängig von den Östrogenen ab [DEVLEESCHOUWER et al. 1986]. Verschiedene Arbeitsgruppen stellten fest, daß nur bei Anwesenheit von Progesteronrezeptoren ein biologisch aktiver Östrogenrezeptor möglich ist [MILGROM et al. 1973; MOHLA et al. 1981]. Progesteron seinerseits bindet ebenfalls an seinen zytosolischen Rezeptor und induziert über die oben beschriebene Effektuierungskette Proteine, welche die Bindungen des Östrogens im Zellkern beeinflussen und eine Reduktion der Konzentration von Östrogen und Progesteron im Zytoplasma bewirken. So hemmt zum Beispiel das Progesteron den proliferativen Effekt des Östrogens [MILGROM et al. 1973].

Diagnostische Aussagekraft und prognostische Signifikanz des Hormonrezeptorstatus beim Mammakarzinom

Östrogenrezeptoren lassen sich abhängig von der verwendeten Nachweismethode in 60 bis 80% der Brustkrebsfälle nachweisen. Progesteronrezeptoren kommen in ca. 40% der Fälle vor [KLINGA et al. 1984; OSBORNE et al. 1990].

Grundsätzlich gilt, daß die Expression von Hormonrezeptoren ein Kennzeichen einer höheren **Tumordifferenzierung** ist. So ließen sich Korrelationen von Östrogenrezeptorpräsenz und histologischen Zeichen einer guten Tumordifferenzierung, zum Beispiel einem niedrigen histopathologischen Grad oder einem diploiden DNA-Gehalt, nachweisen [REMMELE et al. 1986; OSBORNE et al. 1990].

Die **prognostische Signifikanz** des Hormonrezeptorenstatus läßt sich somit zumindest auf der zellulären Ebene diskutieren. Die Östrogenrezeptoren gelten im allgemeinen als wichtiger biologischer Faktor, dem prognostische Bedeutung zukommt [KNIGHT et al. 1977; ALLEGRA et al. 1979]. Patientinnen mit Mammakarzinom, bei denen sich Östrogenrezeptoren nachweisen lassen, haben wahrscheinlich einen indolenteren Verlauf und ein längeres rezidivfreies Intervall sowie eine verlängerte Gesamtüberlebenszeit als solche ohne Östrogenrezeptoren [OSBORNE et al. 1980 und 1990; WILLIAMS et al. 1987]. Diese Prädiktivität ist unabhängig vom Menopausenstatus der Patientin, von der Tumorgroße und vom axillären Lymphknotenstatus [LIPPMAN et al. 1980]. Tumoren ohne nachweisbare Östrogenrezeptoren reagieren signifikant häufiger auf zytotoxische Chemotherapie [LIPPMAN et al. 1980].

Dennoch zeigt sich eine begrenzte klinische Aussagekraft des Hormonrezeptorenstatus bei der notwendigen Unterscheidung zwischen Hoch- und Niedrigrisikopatientinnen mit negativem axillären Lymphknotenstatus. Einige Arbeiten zeigten, daß die Fünfjahresrezidivrate nach Mastektomie bei Patientinnen mit positivem Östrogenrezeptorstatus und negativem Lymphknotenbefund bei ca. 25% liegt im Vergleich zu 33% bei negativem Östrogenrezeptorstatus [FISHER et al. 1988; OSBORNE et al. 1990]. Daraus läßt sich ableiten, daß durch Hormonrezeptordaten allein keine Behandlungsentscheidungen zu treffen sind.

Eine kontroverse Diskussion besteht ebenfalls über die Wertigkeit der Progesteronrezeptorbestimmung als Prognoseindikator. Verschiedene Autoren ermittelten eine Prädiktivität des Progesteronrezeptorstatus für das rezidivfreie Intervall [HOWELL et al. 1984; ROSEMAN et al. 1986].

Der wahrscheinlich größte Wert des Hormonrezeptorenstatus liegt in der Aussagekraft über ein mögliches Ansprechen des Tumors auf **endokrine Therapie**.

Das heißt, daß das Rezeptorassay bei der Auswahl der Patienten behilflich sein kann, die von einer endokrinen Therapie profitieren können. Das somit gezieltere Vorgehen führte zu einer signifikanten Verbesserung des Therapieregimes bei Brustkrebs. Auch das herrschende Meinungsbild erscheint hier homogener. In einer breiten Anzahl von Veröffentlichungen wurde festgestellt, daß ca. 50 bis 60% der Patientinnen mit einem positivem Östrogenrezeptorstatus auf eine endokrine Therapie ansprechen, wogegen nur weniger als 10% der östrogen-negativen Patientinnen von dieser Therapiemethode profitieren konnten [JENSEN et al. 1977; ALLEGRA et al. 1979; BLOOM et al. 1980].

40 bis 50% der Patientinnen mit Östrogenrezeptoren reagieren jedoch nicht auf die durchgeführte endokrine Therapie. Ein Erklärungsmodell hierfür ist die Expression abnormer Östrogenrezeptorvarianten [LEMIEUX et al. 1996]. Da diese Therapie-strategie unter anderem auf eine funktionierende Effektuierungskette angewiesen ist, könnten alterierte Rezeptoren das adäquate Wirken antiöstrogener Pharmaka verhindern.

Durch die gleichzeitige Bestimmung der Progesteronrezeptoren läßt sich der prädiktive Wert der Sensibilität des Tumors gegenüber hormonaler Therapie erhöhen [MANNI et al. 1980]. Es stellte sich heraus, daß bei Patientinnen mit sowohl positivem Östrogenrezeptorstatus als auch positivem Progesteronrezeptorstatus eine Hilfe durch endokrine Therapie in 70 bis 80% der Fälle vorausgesagt werden konnte, wogegen bei zwar östrogen-positiven aber progesteron-negativen Fällen in nur 30% ein Therapieerfolg zu verzeichnen war [SEDLACEK et al. 1984; HUBAY et al. 1984]. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, daß bei Positivität beider Rezeptorenarten ein indolenterer Krankheitsverlauf zu erwarten ist [OSBORNE et al. 1990].

Methoden der Rezeptorbestimmung

Biochemische Bestimmungsmethoden

Hier werden die Dextran-Coated-Charcoal-Methode (DCC) und das Enzymimmunoassay (EIA) unterschieden.

Bei der **DCC-Methode** wird die aktuelle Bindungskapazität „zytosolischer“ Rezeptoren mit [³H]-markierten Liganden bestimmt [EORTC 1980]. Obwohl diese Methode mit einem hohen finanziellen und zeitlichen Aufwand verbunden ist und auch diverse Nachteile und Fehlermöglichkeiten bestehen, galt sie viele Jahre als „goldener Standard“ der Rezeptorbestimmung [DEVLEESCHOUWER et al. 1988].

Das **Enzym-Immuno-Assay** (EIA) ist heute eine vielfältig angewandte Routine-methode. Der Einsatz zur Hormonrezeptorbestimmung wurde durch die Entwicklung von monoklonalen Antikörpern gegen Östrogen- und Progesteronrezeptoren ermöglicht [GREENE et al. 1980 und 1987]. Das Enzym-Immuno-Assay ist schneller durchführbar, billiger, umweltverträglicher und durch eine hohe Präzision und exzellente Reproduzierbarkeit gekennzeichnet [LECLERCQ et al. 1986]. Die DCC-Methode trat deshalb in den letzten Jahren mehr und mehr in den Hintergrund.

Nach wie vor besteht bei beiden Methoden das Problem des unvermeidbaren Einbeziehens nicht karzinomatöser rezeptor-positiver Gewebsanteile in die Analyse. Das kommt letztendlich einem Verdünnungseffekt gleich.

Histologische Bestimmungsmethoden

Durch biochemische Rezeptorbestimmungen erhält man einen Meßwert, welcher bis auf einen Vergleich mit jeweiligen Referenzwerten keinerlei weitere Informationen bietet.

Durch histologische Techniken aber ist es möglich, Rezeptoren direkt topochemisch darzustellen und in ihrer jeweiligen Textur zu beurteilen. Somit wird zum Beispiel eine heterogene Rezeptorenverteilung innerhalb des Tumors sichtbar, deren Ursachen und Gesetzmäßigkeiten bis heute nicht geklärt sind.

Bei semiquantitativen histologischen Bestimmungsmethoden ist durch visuelle Kontrolle der Ausschluß rezeptor-positiver aber nichtmaligner Gewebsanteile sowie die ausschließliche Selektion von Tumorschnitten für die Bestimmung möglich. Weiterhin können durch Anwendung der digitalen Bildanalyse simultan andere Tumorparameter, wie zum Beispiel morphometrische Kriterien, ermittelt werden.

Histologische Rezeptorbestimmungsmethoden sind heute ausschließlich immunhistochemische Techniken. Die **Immunhistochemie** bedient sich in Analogie zu Nachweismethoden wie dem Enzym-Immuno-Assay (EIA) monoklonaler Antikörper, um beliebige Antigenstrukturen in histologischen Schnitten nachzuweisen. Die Untersuchung von Östrogenrezeptoren an Gewebsschnitten wird „Estrogen-Rezeptor-Immuno-Cytochemical-Assay“ (**ER-ICA**) genannt.

Die **grundlegenden Schritte** einer immunhistochemischen Färbung sind:

1. Inkubation mit dem primären monoklonalen Anti-Rezeptor-Antikörper.
2. Inkubation mit dem sekundären Anti-Anti-Rezeptor-Antikörper. Dieser Antikörper ist heute meistens bereits mit der Immunmarkierungssubstanz konjugiert, welche den enzymatischen Umsatz des Chromogens an spezifischem Ort vermittelt.
3. Zusetzen der Chromogenlösung.

Anfänglich ließ sich diese Methode nur an Gefrierschnitten anwenden, was den Einsatz stark limitierte. Jedoch gelang es nach umfangreichen Modifizierungen der Färbeprotokolle, die Technik auch an routinemäßig formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Tumormaterial anzuwenden [MILLER et al. 1993].

Das Hauptproblem des Nachweises am Paraffinschnitt war zunächst eine äußerst niedrige Sensitivität. Ursachen dafür lagen einerseits in einem hohen Rezeptorverlust durch zu spätes und unzureichendes Fixieren der Gewebeproben. Östrogenrezeptoren sind sehr thermolabil und werden durch proteolytische Zellenzyme schon kürzeste Zeit nach Gewebsentnahme zerstört. Andererseits werden die Epitope der Rezeptoren durch den Fixierungs- und Einbettungsprozeß selbst maskiert und werden so von den Antikörpern nicht mehr „erkannt“. Neue Methoden zur Antigendemaskierung wurden deshalb eingeführt. Die Anwendung proteolytischer Enzyme wie Pronase, DNase oder Trypsin wurde anfänglich favorisiert [ANDERSEN et al. 1988]. Heute stehen die Mikrowellenbestrahlung [SANNINO et al. 1994] und die Autoklavierung der Proben [BIER et al. 1995] im Vordergrund.

Es gibt grundsätzlich zwei **Wege der Quantifizierung** des Färbeergebnisses.

Die einfachste Möglichkeit besteht in der semiquantitativen Abschätzung durch Bildung eines sogenannten **Scores** (siehe Tabelle 3). Dabei wird in den meisten Fällen der Anteil der positiven (das heißt rezeptortragenden) Zellkerne mit der eingeschätzten Intensität der Färbung verrechnet.

Tab. 3: Übersicht über die wichtigsten Methoden der semiquantitativen Evaluierung des Färbeergebnisses.

Autor	Score-Name	Formel	Kommentar
McCARTY et al. 1985	Histochemical Score (HSCORE)	$HSCORE = \sum p_i (i+1)$	i: Intensität (0, 1, 2, 3) p _i : % Kerne in einer Intensitätskategorie
REMMELE et al. 1987	Immuno-Reactive-Score (IRS)	$IRS = PP \times SI$	SI: Intensität (0, 1, 2, 3) PP: % pos. Zellen (0,1,2,3,4)
ANDERSEN et al 1988	„Score“	$S = I \times \%PZ \times C \times 100$	I: Intensität (0, 1, 2, 3) %PZ: % positiver Zellen C: Zellularität
SNIJDERS et al. 1990	Immuno-Reactive-Score (IRS)	$IRS = \sum p(i) \times x_i$	i: Intensität (0, 1, 2, 3, 4) p(i): % Kerne in einer Intensitätskategorie

Diese Methoden unterliegen natürlich einem stark subjektiven Einfluß. Zusätzlich werden verschiedene Score-Systeme von den Untersuchern angewandt. Dadurch sind Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen nicht miteinander vergleichbar.

Den Weg zu einer reproduzierbaren immunhistochemischen Rezeptoranalyse sollte die **digitale Bildanalyse** zeichnen. Man stieß jedoch auf gravierende methodische Probleme. Zuerst versuchte man, die Präparations-, Fixierungs- und Färbeprotokolle zu standardisieren. Trotzdem zeigen diese immunhistochemischen Färbungen in praxi eine starke Heterogenität.

Die häufig niedrige Sensitivität führt bei Zellkernen mit Rezeptoren („positiv“) zu nur schwach gefärbten Kernen, welche sich nur schwierig oder interaktiv segmentieren lassen. Zellkerne ohne Rezeptoren („negativ“), welche als Vergleichswert benötigt werden, sind vielfach gar nicht segmentierbar oder müssen umständlich dem Meßprozeß entzogen werden.

Weiterhin müssen unspezifisch gefärbte Präparatanteile sowie nichtmaligne Epithelzellen und Stromazellen mit Rezeptorenbesatz, welche sonst das Meßergebnis verfälschen würden, interaktiv ausgeschlossen werden.

Der Meßvorgang selbst läuft meist in zwei Phasen ab. Damit Gegenfärbung und unspezifische Antikörperbindung aus der Messung eliminiert werden können, wird zuerst mit Hilfe einer Negativ-Kontrolle eine Kernmaske angelegt [AZIZ et al. 1992]. Gemessen werden dann sowohl Flächen (zum Beispiel: „relative positive Fläche“) als auch Intensitäten (zum Beispiel: „mittlere optische Dichte“ oder „integrierte optische Dichte“). Diese Meßwerte können dann in Anlehnung an die Score-Systeme zu einem Endergebnis verrechnet werden.

Es ist heute praktisch möglich, mit digitaler Bildanalyse Hormonrezeptoren an Schnitten des Mammakarzinoms quantitativ zu bestimmen [BADDOURA et al. 1991; AZIZ et al. 1992; ESTEBAN et al. 1993]. Dies ist jedoch an einen sehr hohen zeitlichen Aufwand geknüpft, der eine Routineanwendung verhindert.

Die Frage, ob es überhaupt sinnvoll ist, viel Zeit für die Entwicklung einer in hohem Maße reproduzierbaren und automatisierten Methode zur Rezeptorvermessung am immunhistochemischen Präparat aufzuwenden, wurde von BOJAR 1995 beantwortet. Es wurde versucht, zwischen der Quantität der Östrogenrezeptoren und der Prognose bei Patientinnen mit Mammakarzinom eine Verbindung herzustellen. Klare prognostische Unterschiede gab es lediglich zwischen den Klassen „östrogen-positive Tumoren“ und „östrogen-negative Tumoren“. Das heißt, die genaue Quantität der Östrogenrezeptoren beim Mammakarzinom hat für die Prognose der Erkrankung keine Bedeutung.

1.4 ZUSAMMENHÄNGE ZWISCHEN AgNOR-AUSSTATTUNG UND ÖSTROGENREZEPTORSTATUS BEIM MAMMAKARZINOM

Zusammenhänge zwischen der AgNOR-Ausstattung und dem Östrogenrezeptorstatus bei Mammakarzinomen wurden bis heute nur entweder:

1. durch verschiedene Methoden (zum Beispiel: DCC-Methode versus AgNOR-Parameter) oder
2. durch Untersuchungen an unterschiedlichen Schnitten des zu untersuchenden Falles (zum Beispiel: ER-ICA versus AgNOR-Parameter) verifiziert.

Grundsätzlich gilt: Beim Mammakarzinom existiert eine **inverse Korrelation** zwischen AgNOR-Anzahl und Gehalt an Östrogenrezeptoren.

Das gilt sowohl für biochemisch bestimmte Rezeptorkonzentrationen (DCC) [RÜSCHOFF 1992] als auch mit noch höherer Signifikanz für die immunhistochemische Rezeptoranalyse (ER-ICA) [RÜSCHOFF 1992, GIMÉNEZ-MAS et al. 1996]. Andere AgNOR-Parameter, wie Flächenparameter korrelieren schwächer mit dem Rezeptorgehalt [GIMÉNEZ-MAS et al. 1996].

2 AUFGABENSTELLUNG

Die Bestimmung des Östrogenrezeptorstatus ist Teil der pathologischen Routinediagnostik. Es lassen sich neben Aussagen über die Differenzierung des Tumors und die Ansprechbarkeit gegenüber endokriner Therapie auch Aussagen über die Prognose der Tumorkrankheit treffen.

Die Vermessung von AgNORs an Schnitten des Mammakarzinoms trägt noch experimentellen Charakter. AgNOR-Parameter lassen sich am besten den Proliferationsmarkern zuordnen [BRUGAL 1994; MARTIN 1994]. Jedoch geben sie auch Hinweise auf Differenzierung und Prognose.

Betrachten wir die biologischen Tumoreigenschaften, so beschreiben AgNOR-Merkmale und Östrogenrezeptorstatus unterschiedliche und zum Teil auch gegensätzliche Sachverhalte. Wogegen zum Beispiel größere AgNOR-Mengen häufiger bei schnell proliferierenden, entdifferenzierten Tumoren vorzufinden sind [RÜSCHOFF et al. 1990], ist ein stark positiver Östrogenrezeptorstatus häufiger bei höher differenzierten, niedrigmalignen Tumoren vorhanden [UNDERWOOD 1983].

Zusammenhänge zwischen beiden Markern wurden bisher nur auf Fallebene und nicht auf Zellebene diskutiert. Man weiß nicht, ob östrogen-negative Zellen gleich viel, mehr oder weniger AgNORs haben als östrogen-positive Zellen. Die Untersuchungen zu diesem Thema wurden also entweder mit unterschiedlichen Methoden (zum Beispiel: biochemische versus histologische Ergebnisse) oder durch Studien an unterschiedlichen histologischen Schnitten ermittelt. Geschlußfolgert werden konnte also nur indirekt. Die Ergebnisse sind einheitlich und zeigen statistisch eine inverse Korrelation an [RÜSCHOFF 1992, GIMÉNEZ-MAS et al. 1996]. Das bedeutet, daß je größer die gemessenen AgNOR-Mengen in Mammatumoren sind, desto geringer ist deren Östrogenpositivität und umgekehrt.

Indem man beide Marker unabhängig voneinander untersucht und die Meßergebnisse miteinander korreliert, ist jedoch noch kein direkter Zusammenhang auf zellulärer Ebene nachgewiesen. Dieser Nachweis ist nur durch Untersuchung von AgNORs und Östrogenrezeptoren innerhalb des selben Präparates möglich. Dabei kann die Tumorzelle selbst als Referenzobjekt dienen.

Das Ziel dieser Arbeit besteht deshalb darin, erstmals beide Marker kombiniert auf zellulärer Ebene zu betrachten. Untersucht werden soll auch die Frage, ob es sinnvoll ist, in östrogen-negativen und östrogen-positiven Zellen zu messen oder ob die Aussagefähigkeit bei getrennter Messung oder Reduktion der Messung auf östrogen-negative beziehungsweise östrogen-positive Zellen genauere Aussagen ermöglicht. Vielleicht kann die kombinierte Betrachtung beider Marker Aussagen über das Tumorverhalten oder die Prognose präzisieren.

Zielstellung dieser Pilotstudie soll sein:

1. eine reproduzierbare Färbemethode zu entwickeln, mit welcher es möglich ist, sowohl die Östrogenrezeptoren als auch die NORs im selben Präparat zu färben.
2. festzustellen, ob sich beide simultan angewandten Färbemethoden gegenseitig beeinflussen.
3. eine reproduzierbare Methode zur Vermessung von AgNORs in unterschiedlich gefärbten Zellkernen zu entwickeln.
4. die AgNORs sowohl in östrogen-positiven als auch in östrogen-negativen Zellen zu vermessen.
5. mögliche Unterschiede zwischen östrogen-positiven und östrogen-negativen Zellen hinsichtlich ihrer AgNOR-Anzahl, AgNOR-Fläche sowie der räumlichen Verteilung herauszufinden.
6. zu untersuchen, ob es Zusammenhänge zwischen diesen Ergebnissen und anderen prognostischen Indikatoren gibt.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 PATIENTENGUT UND UNTERSUCHUNGSMATERIAL

Dieser Arbeit liegen Untersuchungen an 49 Mammakarzinomen zugrunde. Dabei handelt es sich um 43 invasiv duktale sowie 6 invasiv lobuläre Mammakarzinome verschiedener histopathologischer Differenzierungsgrade (G1: 14 Karzinome; G2: 26 Karzinome; G3: 9 Karzinome). Die Tumorgröße lag zwischen 6 und 73mm.

Alle Patientinnen wurden infolge ihres Tumorleidens in der Chirurgischen Klinik der Charité behandelt. Das Alter der Patientinnen betrug 34 bis 84 Jahre (im Mittel: 62 Jahre).

Die vorliegenden Gewebeproben stammen ausschließlich aus den Jahren 1994 und 1995. Alle Fälle wurden im Pathologischen Institut der Charité im Rahmen der Routinediagnostik begutachtet und befundet.

Es wurde weiterhin darauf geachtet, daß bei allen verwendeten Fällen sowohl eine biochemische (ER-EIA) als auch eine immunhistochemische (ER-ICA) Analyse der Östrogenrezeptoren vorgenommen wurde. Beim Enzym-Immuno-Assay wurde ein Rezeptorgehalt von über 20 fmol/mg Gesamtprotein als positives Ergebnis gewertet.

3.2 AUFARBEITUNG DES MATERIALS

Ausgangspunkt der Aufarbeitung war in 10%iger Formalinlösung fixiertes und in Form von Paraffinblöcken archiviertes Tumormaterial.

Von diesen Blöcken wurden mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms vom Typ MICROM[®] HM 350 3µm dicke Schnitte hergestellt, welche auf SuperFrost/Plus[®] Objektträger aufgezogen wurden.

Zur topologischen Orientierung wurde von jedem Fall ein Schnitt mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt.

3.3 DIE SIMULTANFÄRBUNG

3.3.1 Die Östrogenrezeptorfärbung - eine immunhistochemische Technik

Materialien

1. Primär-Antikörper:

Immunotech[®] Monoclonal Antibody: Estrogen Receptor Nr. 1344

2. Sekundär-Antikörper und Immunmarkierungssubstanz:

DAKO LSAB[®] 2 Kit K 0674:

Link-Reagenz: biotinylierter Sekundär-Antikörper

Label-Reagenz: Streptavidin mit Alkalischer Phosphatase

3. Substrat/Chromogen:

SIGMA FAST[™]: Fast Red TR/Naphtol AS-MX

4. TRIS-Puffer:

9g TRIS-Base (SIGMA[®]T1503)

68,5g TRIS-HCl (SIGMA[®]T3253)

57,5g NaCl (Serva[®]A30183)

5. Zitratpuffer: (pH=6,0) zum Autoklavieren

Stammlösung: 18,91g Zitronensäure und 120,55g Na-Zitrat-di-Hydrat auf 5l

Stammlösung 1:10 verdünnen

6. Aqua dest

Allgemeine Richtlinien

Ein gründliches **Entparaffinieren** der Schnitte ist notwendig, weil Paraffinreste die unspezifische Hintergrundfärbung erhöhen.

Um die Sensitivität der Methode am Paraffinmaterial zu erhöhen, ist sowohl für eine verbesserte immunhistochemische Färbung [BIER et al. 1995] als auch für eine verbesserte Versilberungsreaktion [ÖFNER et al. 1994] ein **Autoklavieren** der Proben erforderlich, um die nukleären Antigene zu demaskieren. Dieser Arbeitsschritt erfolgt nur einmal und wird vor der immunhistochemischen Färbung durchgeführt.

Der pH-Wert des zum Autoklavieren verwendeten Zitratpuffers muß genau 6,0 betragen. Schon geringe Abweichungen beeinträchtigen nach eigenen Erfahrungen das Färbeergebnis.

Die Schnitte dürfen während der gesamten Präparation nicht austrocknen und müssen daher grundsätzlich in einer **Feuchtkammer** bei 37°C inkubiert werden.

Die aufgetropften Antikörperlösungen dürfen nicht unmittelbar am Rand des Präparates enden, sondern müssen darüber hinaus reichen. Ansonsten kommt es zu lokalen Austrocknungseffekten (sogenannten „**edge“-Effekten**) mit verstärkter unspezifischer Hintergrundfärbung.

Färbeablauf

1. **Entparaffinieren:** 30 Minuten in Xylol
2. **Absteigende Alkoholreihe** zur Rehydratisierung
3. **Immersion** in TRIS-Puffer
4. **Autoklavieren:** 5 Minuten in Zitrat-Puffer (pH=6,0)
5. **Immersion** in TRIS-Puffer
6. **Inkubation mit Primär-Antikörper:**
Verdünnung 1:50
200 µl pro Schnitt, 45 Minuten bei 37°C in Feuchtkammer
7. **Spülen:** 3×2 min in TRIS-Puffer
8. **Inkubation mit biotinyliertem Sekundär-Antikörper:**
entspricht der Link-Reagenz aus dem DAKO LSAB®2 Kit K 0674
2-3 Tropfen pro Schnitt für 30 Minuten bei 37°C in Feuchtkammer
9. **Spülen:** 3×2 min in TRIS-Puffer
10. **Inkubation mit Immunmarkierungssubstanz:**
(Streptavidin mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt)
entspricht der Label-Reagenz aus dem DAKO LSAB®2 Kit K 0674
2-3 Tropfen pro Schnitt für 30 min bei 37°C in Feuchtkammer
11. **Spülen:** 3×2 min in TRIS-Puffer
12. **Inkubation mit Substrat/Chromogen-Lsg.:**
(SIGMA FAST™Fast Red TR/Naphtol AS-MX)
für 5 Minuten
13. **Spülen** mit TRIS-Puffer und Überführen in Aqua dest

3.3.2 Die AgNOR-Färbung - eine Versilberungstechnik

Materialien

1. **Silbernitrat** (Merck® 1.01512.)
2. **Blattgelatine** (farblos)
3. **Ameisensäurelösung**

Allgemeine Richtlinien

Es ist darauf zu achten, daß keine überlagerte **Gelatine** verwendet wird. Dies würde zu einer negativen Beeinflussung des Färbeergebnisses führen [RÜSCHOFF 1992]. Die Gelatine muß zuvor vorsichtig auf einer Thermoplatte mit Magnetrührer aufgelöst werden.

Die **Silber-Kolloid-Gebrauchslösung** muß frisch angefertigt werden, daß heißt maximal eine bis zwei Stunden vor Anwendung.

Das Standard-Färbeschema des histochemischen Labors des Instituts für Pathologie der Charité zur AgNOR-Darstellung wurde in zwei Punkten modifiziert. Zum ersten entfällt das Autoklavieren der Schnitte vor Inkubation mit der Silber-Kolloid-Gebrauchslösung, da dieser Arbeitsschritt schon vor der Östrogenrezeptorfärbung erfolgte. Zum zweiten wird nach der Versilberungsreaktion keine aufsteigende Alkoholreihe durchgeführt. Das würde zwangsläufig zu einem „Ausbleichen“ der Immunfärbung führen.

Das endgültige **Eindecken** der doppelt gefärbten Präparate erfolgt aus dem Aqua dest zuerst mit Crystal-Mount™, welches die empfindlichen Färbungen konserviert und danach mit Kanadabalsam.

Färbeablauf

1. Herstellen der **Färbelösung**
Lösung A: 5g AgNO₃ in 20ml Aqua bidest
Lösung B: 200mg Gelatine in 10ml 1% HCOOH-Lsg.
Lösung B in Lösung A
2. **Inkubation der Schnitte mit der Färbelösung** in einer Glasküvette
Färbung bei Dunkelheit und Raumtemperatur
nach Standardzeit von 20 Minuten mikroskopische Kontrolle der dots
Färbezeit 30min
3. **Spülen** 3×5 min in Aqua dest
4. **Eindecken** mit Kanadabalsam nach Konservierung mit Crystal-Mount™

3.3.3 Das Färberesultat

Östrogen-positive Zellkerne stellen sich im mikroskopischen Bild „rot“ oder „orangerot“ dar. Demgegenüber stehen **östrogen-negative Zellkerne** mit einer „zartgelben“ Färbung. Diese gelbliche Farbe ist als Artefakt der Versilberungsreaktion aufzufassen. Durch diesen Umstand ist der östrogen-negative Zellkern auch als solcher sichtbar und später auch meßtechnisch abgrenzbar, obwohl keine eigentliche Kernfärbung durchgeführt wurde.

Sowohl in östrogen-positiven, als auch in östrogen-negativen Zellkernen zeigen sich die **AgNORs** als kleine „schwarzbräunliche“ punkartige Strukturen (siehe Abbildung 1).

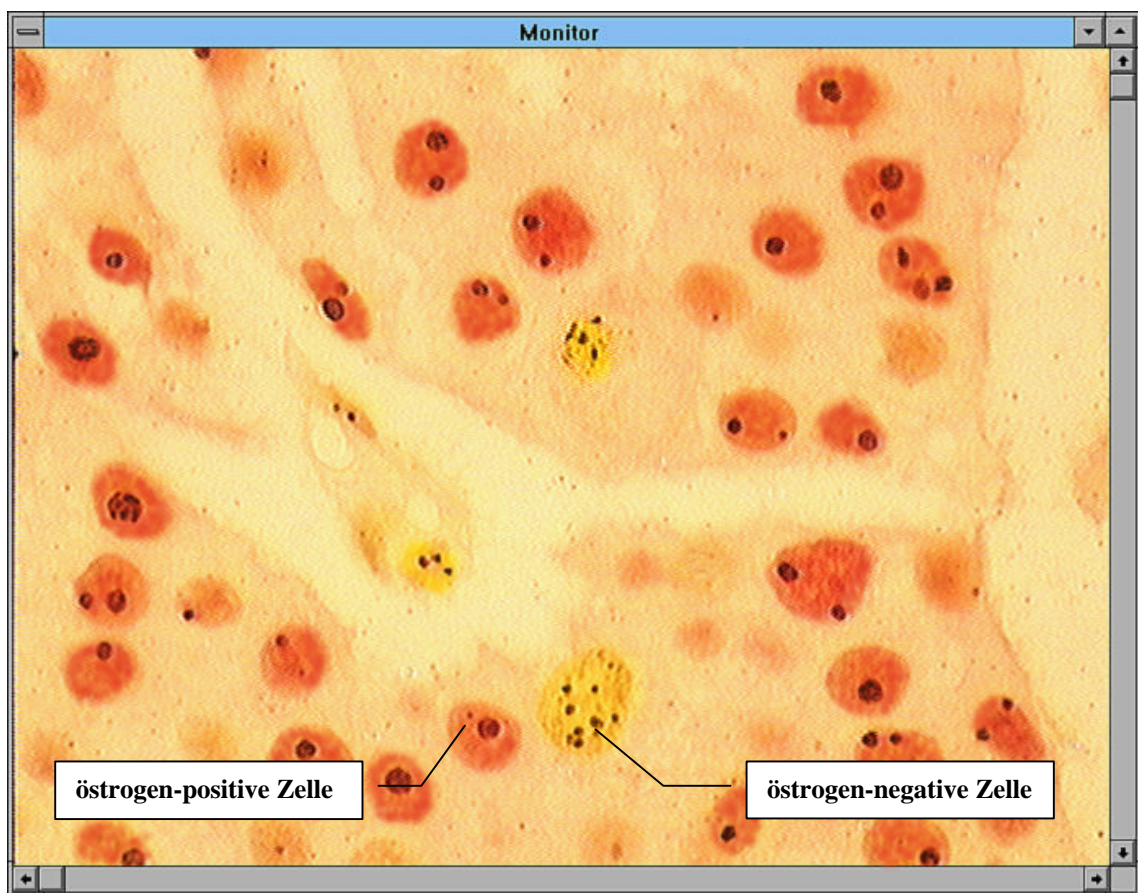


Abb. 1: Zellen eines G2-differenzierten Mammakarzinoms. Simultanfärbung für Östrogenrezeptoren und AgNORs. 105µm×140µm.

3.4 MEßMETHODIK

3.4.1 Das Bildverarbeitungssystem AMBA

Software

Das Softwaresystem AMBA ist Teil des Bildverarbeitungssystems AMBA und wurde im Labor für automatisierte Mikroskopbildanalyse des Pathologischen Institutes der Charité Berlin entwickelt. Die aktuelle Windows-Version von AMBA wird von der IBSB GmbH Berlin angeboten.

Die **Hauptkomponenten** dieses Systems sind [ROTH et al. 1989]:

1. die höhere Programmiersprache LAMBA
2. ein Editor zur Quellprogrammierarbeit
3. ein Compiler zur Erzeugung lauffähiger Programme
4. ein Steuerteil für Dialog und Programmabarbeitung
5. ein Paket von Unterprogrammen

Das System ist vor allem für histometrische und karyometrische Messungen konzipiert.

So läßt sich für jede Fragestellung ein spezielles Meß- und Verarbeitungsprotokoll entwickeln. Der Entwickler kann dabei aus einer Reihe von Prozeduren wählen. Durch ein hohes Maß an Interaktivität kann man unter geringem Zeitaufwand ein „reibungsloses Laufen“ des entwickelten Programmes überprüfen und Änderungen vornehmen.

Hardware

Tabelle 4 gibt Übersicht über das aktuelle Hardwareprofil des Bildverarbeitungssystems AMBA im Labor für automatisierte Mikroskopbildanalyse des Instituts für Pathologie der Charité.

Tab. 4: Hardwareprofil des Bildverarbeitungssystems AMBA

Personal Computer	CPU Pentium 100MHz 32MB RAM MS DOS V 6.20 Windows for Workgroups 3.11
Framegrabber/Graphikkarte	Matrox Comet
Bildverarbeitungssoftware	AMBA (IBSB GmbH, Berlin)
Farbmonitor	Sony Trinitron Multiscan 17 sf
Mikroskop	Jenaval (Carl Zeiss Jena)
Kamera	Sony 3CCD-Color Video Camera

Abbildung 2 zeigt ein Blockschaltbild des gesamten Bildverarbeitungssystems.

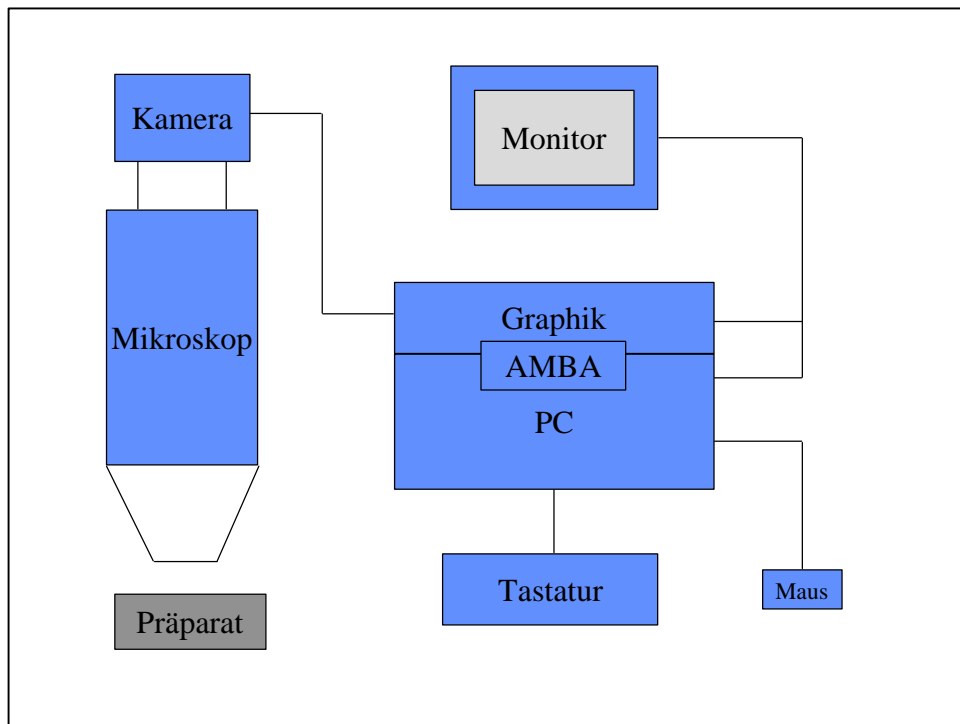


Abb. 2: Blockschaltbild des Bildverarbeitungssystems AMBA

3.4.2 Interaktive AgNOR-Vermessung mit dem Programm AMBA*norcolor*

Für die Vermessung von AgNORs in farbig markierten Zellen wurde das Programm AMBA*norcolor* entworfen. Dieses Programm wurde unter AMBA geschrieben und speziell an die Aufgabenstellung angepaßt.

Als generelles Problem stellte sich zunächst die **Zellkernsegmentierung** heraus. Wogegen sich „rote“ östrogen-positive Kerne von AMBA gut segmentieren ließen, zeigten die „zartgelben“ östrogen-negativen Kerne im Farbbild einen nur schwachen Kontrast zum Hintergrund.

Die Verwendung eines RGB-(Farb)-Bildes mit der Ablage jedes Teilbildes (Rot, Grün, Blau) in einem separaten Bildspeicher der Grafikkarte ermöglichte das Überprüfen der Kontraststärke der östrogen-negativen Zellkerne im jeweiligen Teilbild.

Im Rot-Bild zeigten zwar die östrogen-positiven Kerne maximalen Kontrast, die östrogen-negativen Zellen waren jedoch nahezu unsichtbar. Im Blau-Bild wurden beide Zellarten nicht außerordentlich kontrastreich dargestellt. Im Grün-Bild zeigten die

östrogen-negativen Kerne ihren maximalen, die östrogen-positiven einen vertretbar starken Kontrast. Somit wurde das Grün-Bild zur Zellkernsegmentierung ausgewählt.

Auch zur **Segmentierung der AgNORs** wurden die drei RGB-Bildkomponenten hinsichtlich des maximalen Kontrastes überprüft und das Rot-Bild gewählt. Der Untersucher sieht diese grünen und roten Teilbilder nicht. Ihm wird während des gesamten Untersuchungsablaufes das native gesamte RGB-Bild präsentiert.

Die Segmentierung sowohl der Kerne als auch der AgNORs erfolgt unter AMBA automatisch mit Hilfe einer Konturfolgerechnung. Die Erkennung des Objektes wird hierbei von einem hierarchischen Klassifikator überwacht. Dem Untersucher wird das jeweilige Segmentierungsergebnis mit Hilfe eines farbigen Overlays angezeigt. Versagt die automatische Segmentierung, ist eine interaktive Korrektur möglich. Mit der Bestätigung der erfolgreichen Segmentierung des jeweiligen Zellkerns oder der AgNORs durch den Untersucher wird im Hintergrund des Programmes der Vermessungsprozeß des Objektes in Gang gesetzt.

Die Vermessung eines simultan gefärbten Präparates erfolgte grundsätzlich in zwei Arbeitsgängen. Im ersten Schritt wurden nur östrogen-positive Zellen, im zweiten Schritt nur östrogen-negative Zellen vermessen.

Die **Klassifikation** der Zellen als „östrogen-positiv“ oder „östrogen-negativ“ erfolgte im Farbbild durch das Auge des Untersuchers. Als „östrogen-positiv“ wurden dabei alle Tumorzellkerne bezeichnet, welche eine Rotfärbung zeigten, egal ob sich diese als schwach oder stark darstellte. Als „östrogen-negativ“ wurden jene Tumorzellkerne definiert, die keine Rotfärbung aufwiesen.

Es wurden jeweils einhundert Zellen einer Zellklasse in die Messungen einbezogen. Waren weniger als einhundert Zellen einer Klasse verfügbar, wurden nur alle verwertbaren Zellen gemessen.

Die **Mikroskop- und Kameraeinstellungen** wurden über die gesamte Meßserie konstant gehalten. Es wurde mit KÖHLERScher Beleuchtung und vierhundertfacher Vergrößerung (Objektiv×40; Projektiv×10; Bildausschnitt: 105µm×140µm) gearbeitet.

Die **prinzipiellen Arbeitsschritte** der Vermessung werden im Folgenden kurz erläutert.

1. Zuerst werden im Testpräparat im Vergleich zum HE-Schnitt die entsprechenden Tumorbereiche ausgewählt und markiert.
2. Nach Einstellen des zu vermessenden Bildausschnittes im Präparat erfolgt eine Abstimmung der Helligkeit, des Kontrastes und des Fokus mit visueller Kontrolle des Monitorbildes.
3. Durch den „Scan“-Befehl wird jetzt der gewählte Ausschnitt in den Bildspeicher der Graphikkarte eingelesen.

4. Die automatische Segmentierung des einzelnen Zellkerns wird eingeleitet, indem man mit der Maus das Fadenkreuz (Cursor) im Monitorbild in Deckung mit der Kontur eines Zellkerns bringt und die linke Maustaste betätigt. Gelingt die automatische Segmentierung nicht sofort, lassen sich die Schwellenwerte für die Konturfolge einfach interaktiv verschieben. Weiterhin besteht die Möglichkeit einer manuellen Konturfolge und des Einfügens von Trennungslinien mit der rechten Maustaste.
5. Die erfolgreiche Kernsegmentierung wird nun mit der mittleren Maustaste bestätigt.
6. Mit dieser Bestätigung wird automatisch die Fläche des Zellkerns bestimmt und nachfolgend die automatische Segmentierung der AgNORs im Zellkern durchgeführt. Der Schwellenwert für die AgNOR-Segmentierung läßt sich an dieser Stelle ebenfalls interaktiv verändern. Aus Standardisierungsgründen wird jedoch diese Schwelle nur einmal pro Präparat eingestellt.
7. Die adäquate AgNOR-Segmentierung wird wiederum mit der mittleren Maustaste bestätigt, womit eine automatische Vermessung der AgNORs hinsichtlich Anzahl, Fläche und Verteilung durchgeführt wird. An dieser Stelle des Programmes besteht die Möglichkeit, eine fehlerhafte Messung des zuletzt vermessenen Zellkerns aus dem Meßprotokoll zu eliminieren.

Es wurden jeweils alle der klassenzugehörigen Tumorzellkerne im Bildausschnitt in die Messungen einbezogen. Nach Abarbeitung eines Ausschnittes wurde zum nächsten Areal gewechselt und mit der Schrittfolge von vorn begonnen.

In einem Datenfenster werden zu jedem Zeitpunkt die Anzahl der schon vermessenen Zellkerne ausgegeben. Abgebrochen wurde entweder nach einhundert Zellen, oder wenn nach Durchsuchen von fünf Gesichtsfeldern kein weiterer östrogen-positiver oder östrogen-negativer Zellkern zu finden war.

3.4.3 Beschreibung der gemessenen AgNOR-Parameter

Anzahlmerkmale:

Nr.	Merkmal	Erklärung	Einheit
1	NORNMB_M	unkorrigierte Anzahl der AgNORs pro Zellkern, d.h. AgNOR-Cluster werden als ein AgNOR gezählt; Mittelwert	Anzahl
2	NORNBC_M	korrigierte Anzahl der AgNORs pro Zellkern, d.h. AgNOR-Cluster werden als zwei AgNORs gezählt; Mittelwert	Anzahl
3-13	NOR_Kx (x=1...10)	Anzahl der Zellkerne mit x AgNORs (11 Gruppen: x=0; x=1; ...; x=10)	Promille

Flächenmerkmale:

Nr.	Merkmal	Erklärung	Einheit
14	AREA_M	Zellkernschnittfläche; Mittelwert	μm^2
15	S_AREA_M	Summe der Schnittflächen aller AgNORs pro Zellkern; Mittelwert	μm^2
16	MAXNOR_M	Anschnittsfläche des größten AgNORs im Zellkern; Mittelwert	μm^2
17	MEANAR_M	Mittlere Anschnittsfläche der einzelnen AgNORs; Mittelwert (S_AREA_M/NORNBC_M)	μm^2
18	SNAR_R_M	Verhältnis der Schnittfläche der einzeln gelegenen AgNORs zur Summenfläche der AgNORs; Mittelwert (MEANAR_M/S_AREA_M)	Promille
19	AR_RAT_M	Verhältnis der AgNOR-Summenfläche zur Zellkernfläche; Mittelwert (S_AREA_M/AREA_M)	Promille
20	MN_RAT1_M	Verhältnis max. AgNOR-Fläche im Zellkern zur Zellkernfläche; Mittelwert (MAXNOR_M/AREA_M)	Promille
21	MN_RAT2_M	Verhältnis max. AgNOR- Fläche zur AgNOR- Summenfläche; Mittelwert (MAXNOR_M/S_AREA_M)	Promille
22	SIZRAT_M	Verhältnis mittlere AgNOR- Fläche pro Kern zur Zellkernfläche; Mittelwert (MEANAR_M/AREA_M)	Promille

Lokalisationsmerkmale: Merkmale, welche die Lage der AgNORs im Zellkern und zueinander beurteilen.

Nr.	Merkmal	Erklärung	Einheit
23	CENTER_M	Anzahl der zentral im Zellkern gelegenen AgNORs; Mittelwert	Anzahl
24	CENT_R_M	Anteil der zentral im Zellkern gelegenen AgNORs an der korrigierten Gesamtzahl der AgNORs; Mittelwert	Promille
25	BORDER_M	Anzahl der randständigen AgNORs pro Zellkern; Mittelwert	Anzahl
26	BORD_R_M	Anteil der randständig gelegenen AgNORs an der korrigierten Gesamtzahl der AgNORs; Mittelwert	Promille
27	LOCAT_M	Abstand der AgNORs vom Zentrum der Ellipse (welche die idealisierte Zellkernform darstellt) im Verhältnis zur langen Achse; Mittelwert	μm^2
28-38	LOC_Kx (x=0;100;...;1000)	Anzahl der AgNORs, die innerhalb eines bestimmten Flächenringes mit Ellipsen- bzw. Zellkernzentrum als zentralem Bezugspunkt liegen, Aufteilung des Zellkerns in 11 zirkuläre Flächenbereiche	Anzahl
39	MDIST_M	mittlerer Abstand der AgNORs zueinander; Mittelwert	μm^2
40	MAXDIS_M	maximaler Abstand zweier AgNORs zueinander; Mittelwert	μm^2

3.5 STATISTIK

Die statistische Bearbeitung der erhaltenen Meßwerte wurde mit dem Statistikprogramm **NCSS 5.1** (copyright 1991 by Dr. Jerry L. Hintze, 329 North 1000 East Kaysville, Utah 84037 [801] 5460445) durchgeführt.

Der im Bildverarbeitungssystem AMBA angelegte Datenfile wurde nach Abschluß der Messungen in ein ASCII-Format transformiert und in NCSS eingelesen.

Zur Ermittlung des Signifikanzniveaus und zum Vergleich der Gruppenmittelwerte wurde der t -Test für gleiche oder ungleiche Varianzen durchgeführt. Lag das Ergebnis des F -Tests bei $F > 0,1$, so wurde der t -Test für gleiche Varianzen durchgeführt. Bei $F < 0,1$ wurde von ungleichen Varianzen ausgegangen.

Korrelationen wurden mit dem PEARSON-Korrelationskoeffizienten r für metrische Korrelationen oder dem SPEARMANS-Korrelationskoeffizienten r für Rangkorrelationen überprüft. Die Koeffizienten können dabei Werte zwischen -1 und $+1$ annehmen.

4 ERGEBNISSE

4.1 BEEINFLUSSUNG DER MEßERGEBNISSE DURCH DIE SIMULTANFÄRBUNG

Die ersten Untersuchungen galten der Frage, ob die simultane Färbung eines Präparates mit der Östrogenrezeptorfärbung und der AgNOR-Färbung das Färbeergebnis und somit die Meßergebnisse beeinflusst.

Dabei ist sowohl der Einfluß der Simultanfärbung auf die AgNOR-Vermessung als auch der Einfluß der AgNOR-Färbung auf die Östrogenmarkierung zu beleuchten. Beide Faktoren könnten theoretisch unabhängig voneinander und auch in beiden möglichen Richtungen verändert sein.

Diese Tests sind als ein wichtiger Teil der Arbeit zu werten, da das Ergebnis darüber entscheidet, ob Messungen an derart gefärbten Präparaten reproduzierbar und vergleichbar, also überhaupt sinnvoll sind.

Es wurden stichprobenartig 10 Fälle für diese Reproduzierbarkeitsuntersuchungen ausgewählt. Nur zwei Einschußkriterien wurden hierbei verwirklicht. Es handelt sich bei den 10 Fällen allein um invasiv duktales Mammakarzinome. Davon sind 5 Fälle hinsichtlich eines Östrogenrezeptornachweises sowohl immunhistochemisch (Östrogen-Rezeptor-Immuno-Cytochemical-Assay), als auch biochemisch (Enzym-Immuno-Assay) negativ. Bei den anderen 5 Fällen konnten mit beiden Methoden Östrogenrezeptoren nachgewiesen werden.

4.1.1 Einfluß der Simultanfärbung auf die AgNOR-Darstellung

Zunächst gilt es zu untersuchen, ob eine zusätzliche Östrogenrezeptorfärbung die Darstellung der AgNORs in den Tumorzellen beeinflusst und somit eine Veränderung der Meßwerte im Hinblick auf Anzahl, Fläche oder sogar Verteilung der AgNORs bewirkt.

Von den 10 ausgewählten Fällen wurde jeweils ein Präparat allein mit der AgNOR-Färbung, ein anderes sowohl mit der Östrogenrezeptorfärbung als auch mit der AgNOR-Färbung behandelt. Die AgNOR-Färbung wurde bei beiden Präparatearten gleichzeitig und in der gleichen Färbeküvette durchgeführt, um konstante Färbbedingungen zu schaffen.

Nachfolgend wurden die Präparate mit Hilfe des Programms AMBA\color am Bildverarbeitungssystem vermessen. Bei den simultan gefärbten Präparaten wurde hier nicht zwischen östrogen-positiven und östrogen-negativen Zellen unterschieden. Bei den nur mit Silber imprägnierten Präparaten ist das ohnehin nicht möglich. Pro Präparat gingen zweihundert Tumorzellkerne in die Messung ein.

Es wurde streng darauf geachtet, daß bei den zwei unterschiedlich gefärbten Präparaten eines Falls jeweils in korrespondierenden Gesichtsfeldern gemessen wurde. Dafür wurde vor der Messung im mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Standardpräparat ein charakteristisches Tumorareal mit topologischen Orientierungsmöglichkeiten (zum Beispiel: Gefäße, Bindegewebsstränge, Tumornekrose etc.) ausgewählt und auf die Vermessungspräparate übertragen. Ausschließlich innerhalb dieser markierten Flächen wurde durch systematisches mäanderartiges Abfahren der Gesichtsfelder der Meßvorgang durchgeführt.

Trägt man in Abbildung 3 die mittlere korrigierte AgNOR-Anzahl pro Zellkern (NORNBC_M), welche bei AgNOR-Einzelfärbung ermittelt wurde, gegen die AgNOR-Anzahl bei simultan gefärbten Präparaten auf, so zeigt sich eine ausgesprochen hohe Korrelation ($r=0,961$).

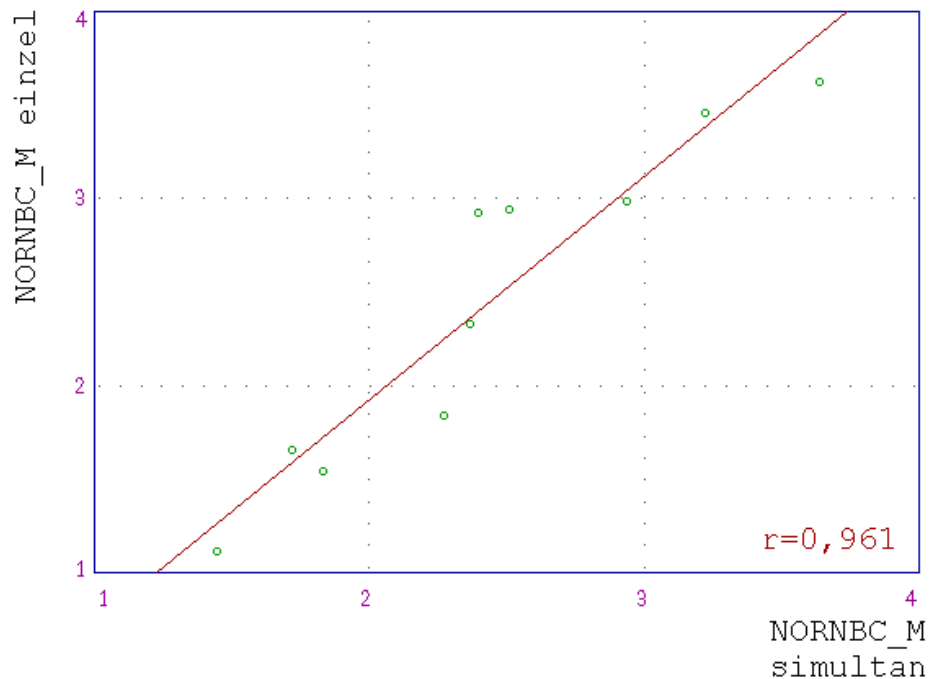


Abb. 3: Korrelation zwischen der mittleren korrigierten AgNOR-Anzahl pro Zellkern bei AgNOR-Einzelfärbung (NORNBC_M einzel) und Simultanfärbung (NORNBC_M simultan).

Betrachtet man in Abbildung 4 die mittleren Summenflächen der AgNORs pro Zellkern (S_AREA_M) in einzeln und simultan gefärbten Präparaten, so bietet sich ein ähnliches Bild ($r=0,976$).

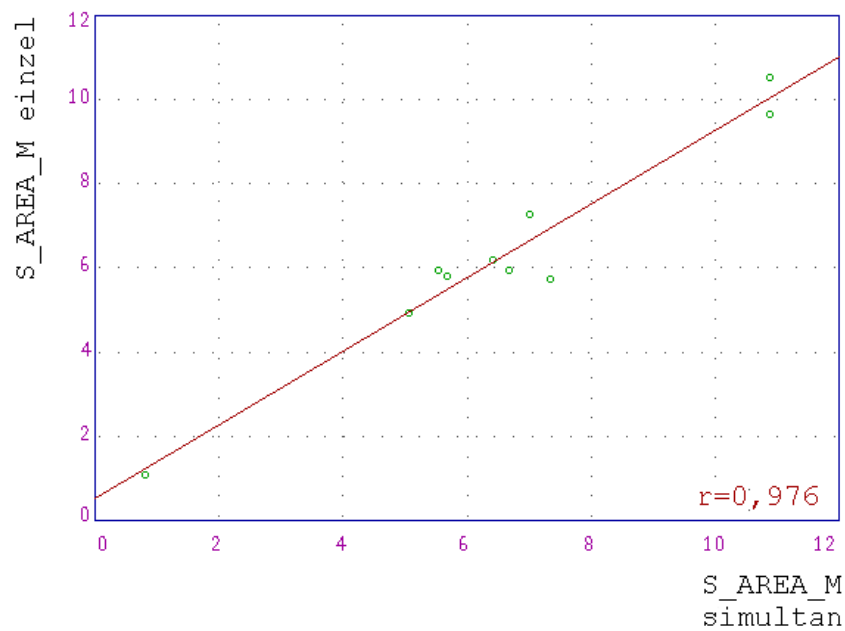


Abb. 4: Korrelation zwischen den mittleren AgNOR-Summenflächen pro Zellkern bei AgNOR-Einzelfärbung (S_AREA_M Einzel) und Simultanfärbung (S_AREA_M simultan).

Tabelle 5 stellt noch einmal die mittleren AgNOR-Anzahlen und mittleren AgNOR-Summenflächen bei Einzelfärbung und Simultanfärbung gegenüber.

Tab. 5: Mittlere AgNOR-Anzahlen und mittlere AgNOR-Summenflächen bei Einzelfärbung und Simultanfärbung.

Nr.	Mittl. AgNOR-Anzahl pro Zellkern		Differenz	Mittl. AgNOR-Summenfläche pro Zellkern [μm^2]		Differenz
	Einzelfärbung	Simultanfärbung		Einzelfärbung	Simultanfärbung	
1	1,83	1,55	0,28	4,93	5,00	-0,07
2	1,72	1,65	0,07	5,80	5,66	0,14
3	2,51	2,93	-0,42	5,73	7,33	1,60
4	3,63	3,62	0,01	5,93	5,53	0,40
5	1,45	1,11	0,34	1,06	0,80	0,26
6	2,39	2,92	-0,53	9,66	10,86	-1,20
7	2,94	2,99	-0,05	10,53	10,68	-0,15
8	2,27	1,84	0,43	7,26	7,00	0,26
9	2,36	2,33	0,03	6,20	6,40	-0,20
10	3,22	3,46	-0,24	5,93	6,66	-0,73
Mittelwerte	2,43	2,44	-0,008	6,30	6,59	0,031

Es läßt sich zusammenfassen, daß es sowohl bei den mittleren AgNOR-Anzahlen pro Zellkern (NORNBC_M) als auch bei den mittleren Summenflächen aller AgNORs pro Zellkern (S_AREA_M) eine hohe Korrelation zwischen den allein mit der AgNOR-Reaktion gefärbten Präparaten und den simultan gefärbten Präparaten gibt.

Somit kann man schlußfolgern, daß die zusätzliche Östrogenmarkierung der Simultanfärbung **keinen Einfluß** auf die Darstellung der AgNORs im Zellkern hat.

4.1.2 Einfluß der Simultanfärbung auf die Östrogenrezeptormarkierung

In diesem Teil der Reproduzierbarkeitsuntersuchung soll ermittelt werden, ob die zusätzliche AgNOR-Markierung bei der Simultanfärbung die Östrogenrezeptorfärbung beeinflusst.

Von den 10 Testfällen wurde jeweils ein Präparat nur mit der Östrogenrezeptorfärbung behandelt, ein anderes Präparat wurde simultan gefärbt. Die Östrogenrezeptorfärbung erfolgte bei den zwei unterschiedlichen Färbewegen wiederum gleichzeitig, um eine Konstanz der Färbebedingungen zu gewährleisten.

Der **mikroskopische Vergleich** der fertiggestellten Präparate ließ keine mit dem Auge erfaßbaren Unterschiede hinsichtlich Farbe, Farbintensität sowie Anzahl der positiv markierten Zellen erkennen.

Die 5 östrogen-negativen Fälle wurden nach gründlicher Untersuchung aussortiert. Bei diesen Fällen konnten sowohl bei der Einzelfärbung als auch bei der Simultanfärbung keine positiven Tumorzellen nachgewiesen werden. Damit entfällt jede Zählung oder Score-Erstellung. Geschlußfolgert werden kann jedoch, daß die Simultanfärbung zu keiner Erhöhung der Sensitivität der Östrogenrezeptormarkierung führt.

Zur genauen Evaluierung des Färbeergebnisses bei den 5 östrogen-positiven Fällen wurde die Anzahl der positiv markierten Zellen pro Gesichtsfeld gezählt. Dazu wurden sowohl die einzeln mit der Östrogenrezeptorfärbung behandelten Präparate als auch die simultan mit Östrogenrezeptor- und AgNOR-Färbung behandelten Präparate verwendet. Es wurden bei allen Präparaten sechs Gesichtsfelder nach dem Korrespondenzprinzip vermessen.

Die **Zählung der markierten Zellen** erfolgte halbautomatisch mit Hilfe des Zählprogrammes AMBA\ak_zael. Dieses Programm ermöglicht die interaktive Zählung von Objekten innerhalb eines Mikroskopbildes und ist dem Bildverarbeitungssystem AMBA angepaßt. Dabei bringt der Untersucher den Cursor mit Hilfe der Maus in Deckung mit dem zu zählenden Einzelobjekt und bestätigt mit der linken Maustaste. Genau an dieser Stelle wird eine farbige Markierung generiert, womit das bereits vermessene Einzelobjekt gekennzeichnet ist und nicht mehrfach in die Messung eingehen kann.

Bei der Messung wurden alle im Gesichtsfeld dargestellten östrogen-positiven Zellkerne gezählt. Aus Standardisierungsgründen wurden alle angeschnittenen Zellkerne am oberen und rechten Bildrand als vollständige Zellkerne betrachtet und gezählt, wogegen alle angeschnittenen Zellkerne am unteren und rechten Bildrand ausgeschlossen wurden.

Die **Mikroskopeinstellungen** wurden der Fragestellung angepaßt. Die Vergrößerung mußte dabei niedrig genug sein, um maximal viele Zellkerne in einem Gesichtsfeld darzustellen. Andererseits mußte die Vergrößerung aber hoch genug sein, um die einzelnen Zellkerne noch deutlich diskriminieren zu können. Es wurde nach Vorversuchen mit zweihundertfacher Vergrößerung gearbeitet (Objektiv×25; Projektiv×10; Tubuslinse×0,8).

Zuerst einmal interessierte die Frage nach der **Reproduzierbarkeit** der Messung der Anzahl markierter Zellen in Abhängigkeit von der Anzahl der ausgezählten Gesichtsfelder.

Aus den erhaltenen Meßwerten wurden gemittelt über alle fünf Fälle die Variationskoeffizienten der Anzahl markierter Zellen in Abhängigkeit von der Anzahl der ausgezählten Gesichtsfelder ermittelt. Der **Variationskoeffizient CV** ($CV = s / \bar{x}$) beschreibt hier die mittlere Abweichung des Meßwertes bei Wiederholungsmessung.

Tabelle 6 zeigt die zunehmende Abnahme des Variationskoeffizienten mit steigender Anzahl ausgezählter Gesichtsfelder gemittelt über 5 vermessene Fälle. Mit $\pm 3,1\%$ Abweichung vom Mittelwert ist bereits bei drei ermittelten Gesichtsfeldern eine ausreichende Genauigkeit erreicht.

Tab. 6: Verhalten des Variationskoeffizienten CV in Abhängigkeit von der Anzahl der ausgezählten Gesichtsfelder.

Anzahl ausgezählter Gesichtsfelder	CV gemittelt über 5 Fälle
1	0,1380
2	0,0630
3	0,0313
4	0,0287
5	0,0269
6	0,0261

Für einen Testfall sind in Abbildung 5 diese Mehrfachmessungen zur Bestimmung des Variationskoeffizienten grafisch dargestellt.

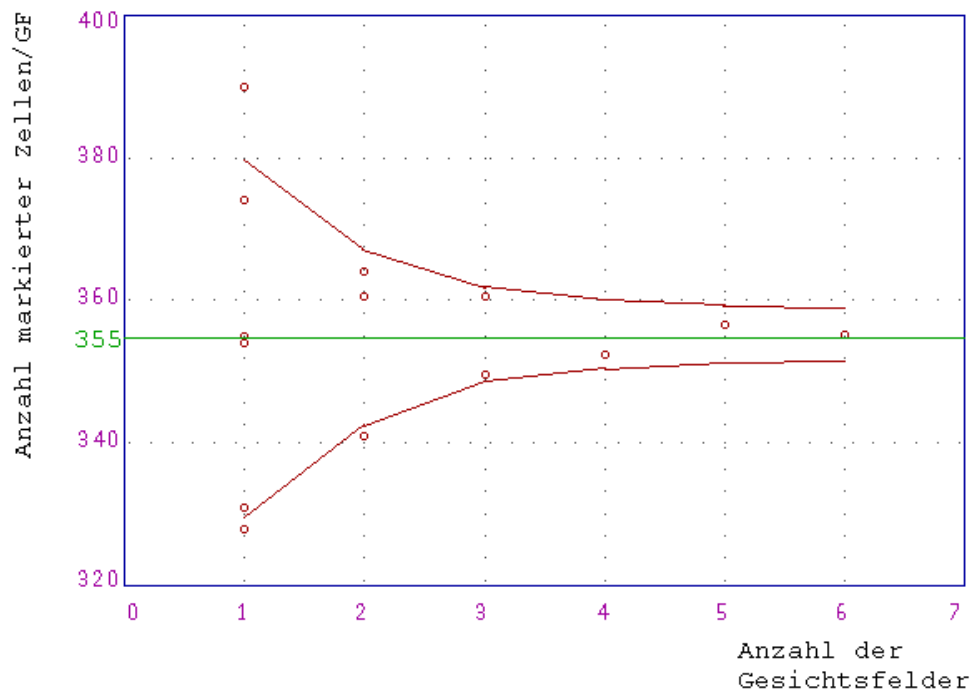


Abb. 5: Reproduzierbarkeit der Bestimmung der Anzahl markierter Zellen pro Gesichtsfeld in Abhängigkeit von der Anzahl der ausgezählten Gesichtsfelder für einen Testfall. Die **grüne Linie** markiert den Mittelwert. Die **roten Linien** stellen das Verhalten der Variationskoeffizienten CV gemittelt über 5 Testfälle dar.

Eine weitere Zielstellung dieser Untersuchung liegt im **Nachweis der Unabhängigkeit** der Östrogenrezeptorfärbung von Färbeeinflüssen der AgNOR-Versilberungsreaktion. In Abbildung 6 wurde die Anzahl aller östrogen-positiven Zellen in insgesamt sechs Gesichtsfeldern bei einzelner Östrogenrezeptormarkierung der entsprechenden Anzahl bei Simultanfärbung gegenübergestellt. Es zeigt sich hier eine hochsignifikante Korrelation ($r=0,988$).

Anscheinend werden also bei Einzelfärbung und Simultanfärbung mit der Östrogenrezeptorfärbung die gleichen Tumorzellen markiert. Es läßt sich nun schlußfolgern, daß die Silberreaktion der AgNOR-Färbung **keinen Einfluß** auf die Immunmarkierung der Östrogenrezeptoren hat.

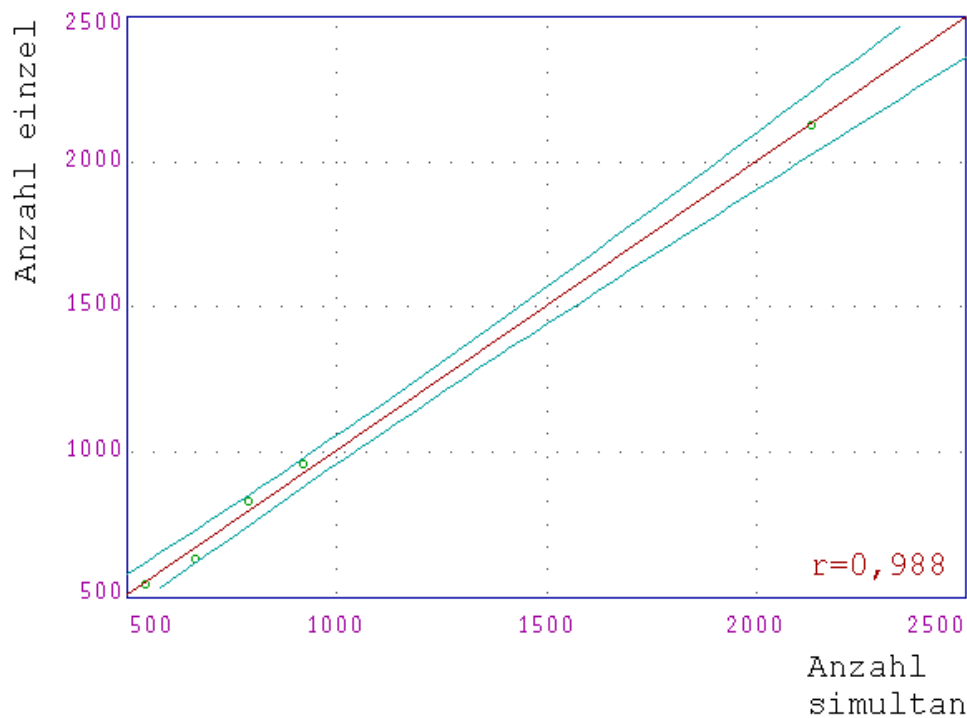


Abb. 6: Korrelation zwischen Gesamtanzahl östrogen-positiver Zellen in sechs Gesichtsfeldern bei einzelner Östrogenrezeptorfärbung (Anzahl einzel) und Simultanfärbung (Anzahl simultan).

Zusammenfassend kann man feststellen, daß weder die Östrogenrezeptorfärbung einen Einfluß auf AgNOR-Darstellung hat noch die AgNOR-Färbung die Östrogenrezeptormarkierung beeinflusst. Es kann also als nachgewiesen gelten, daß das gleichzeitige Färben beider Marker ein reproduzierbares und in jeder Hinsicht spezifisches Färberegebnis liefert. Damit sind die folgenden Messungen gerechtfertigt.

4.2 UNTERSCHIEDE ZWISCHEN ÖSTROGEN-POSITIVEN UND ÖSTROGEN-NEGATIVEN ZELLEN HINSICHTLICH IHRER AgNOR-AUSSTATTUNG

Die folgenden Untersuchungen gelten der Frage, ob und welche Unterschiede es zwischen östrogen-positiven und östrogen-negativen Zellen beim Mammakarzinom hinsichtlich der AgNOR-Ausstattung gibt.

Die simultan mit der Östrogenrezeptorfärbung und AgNOR-Reaktion gefärbten Präparate wurden dazu mit dem Meßprogramm *AMBA\norcolor* vermessen. Dazu

wurden von jeder Zellart einhundert Zellkerne vermessen. Östrogen-positive und östrogen-negative Zellen wurden in separaten Datenfiles abgelegt.

AgNORs stellen sich innerhalb des Zellkerns als schwarze punktähnliche Strukturen dar. Sie lassen sich hinsichtlich ihrer Anzahl, Fläche und Lokalisation im Zellkern charakterisieren.

4.2.1 AgNOR-Anzahl

Betrachtet man die AgNOR-Anzahlen bei östrogen-positiven und östrogen-negativen Zellen (Tabelle 7), so zeigen sich eine Reihe hochsignifikanter Unterschiede.

Grundsätzlich weisen östrogen-negative Zellen höhere AgNOR-Anzahlen als östrogen-positive Zellen auf.

Tab. 7: Mittelwert und Standardabweichung sowie Signifikanzniveau p (t -Test) der AgNOR-Anzahlparameter.

Merkmal	Mittelwert und Standardabweichung ($\bar{x} - s$)		Signifikanzniveau p (t -Test)
	Östrogen-neg. Zellen	Östrogen-pos. Zellen	
NORNMB_M unkorrigierte AgNOR-Anzahl pro Zellkern	2,95 \pm 0,62	1,49 \pm 0,26	0,0001
NORNBC_M korrigierte AgNOR-Anzahl pro Zellkern	3,06 \pm 0,67	1,65 \pm 0,34	0,0001
NOR_K1 Anzahl der Zellkerne mit 1 AgNOR [%]	66,24 \pm 53,66	556,46 \pm 180,48	0,0001
NOR_K2 Anzahl der Zellkerne mit 2 AgNORs [%]	288,36 \pm 146,78	271,88 \pm 86,15	0,5370
NOR_K3 Anzahl der Zellkerne mit 3 AgNORs [%]	346,88 \pm 98,73	111,317 \pm 84,71	0,0001
NOR_K4 Anzahl der Zellkerne mit 4 AgNORs [%]	184,10 \pm 104,43	38,90 \pm 38,13	0,0001
NOR_K5 Anzahl der Zellkerne mit 5 AgNORs [%]	68,27 \pm 68,19	11,56 \pm 29,93	0,0001

Östrogen-negative Zellen haben ungefähr doppelt so viele AgNORs wie östrogen-negative Zellen.

Die **Korrektur** der mittleren AgNOR-Anzahl pro Zellkern erfolgt durch einen Rechenprozeß, welcher zusammenhängende AgNOR-Flächen, die größer als ein Schwellenwert sind, als zwei einzelne AgNORs klassifiziert.

Während sich durch die Korrekturrechnung bei östrogen-negativen Zellen die AgNOR-Anzahl im Mittel von 2,95 auf 3,06 um nur 3,7% erhöht, gibt es bei den östrogen-positiven Zellen einen Zuwachs von 10,7% von 1,49 auf 1,65. Das deutet auf eine erhöhte Clusterung der AgNORs bei östrogen-positiven Zellen hin.

In Abbildung 7 wird der Unterschied zwischen östrogen-positiven und östrogen-negativen Zellen hinsichtlich der mittleren korrigierten AgNOR-Anzahl pro Zellkern (NORNBC_M) grafisch dargestellt.

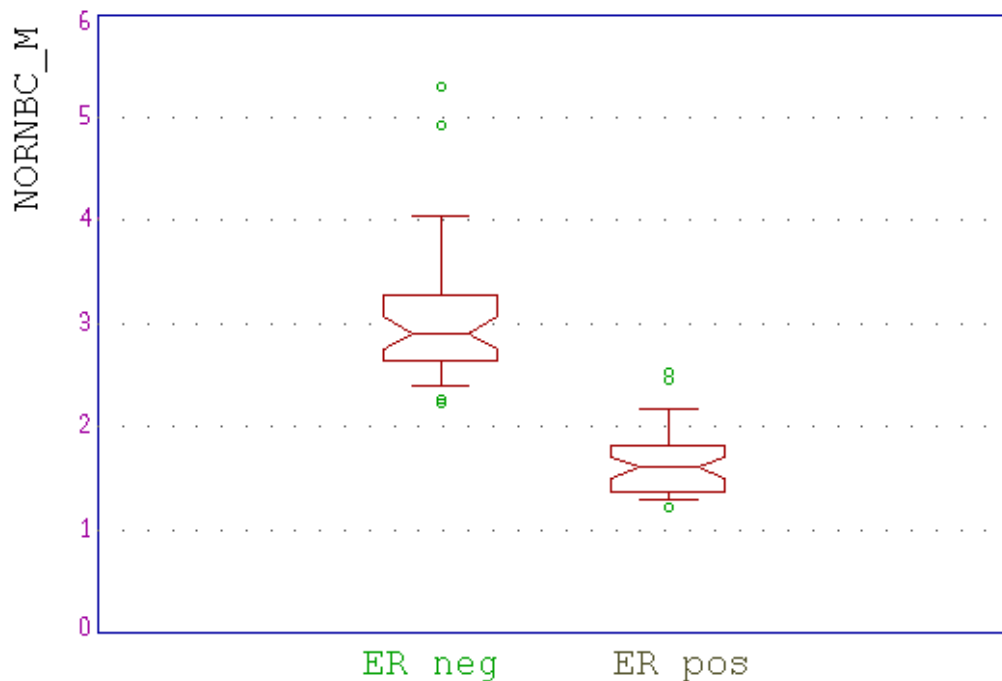


Abb. 7: Mittlere korrigierte AgNOR-Anzahl pro Zellkern (NORNBC_M) bei östrogen-negativen (ER neg) und östrogen-positiven (ER pos) Zellen.

Betrachtet man in Abbildung 8 die relativen Zellkernanzahlen mit jeweils unterschiedlichen AgNOR-Anzahlen, so wird ein weiterer Unterschied zwischen beiden Zellgruppen deutlich.

Bei östrogen-positiven Zellen hat der weitaus größte Anteil der Tumorzellen nur ein AgNOR oder AgNOR-Cluster aufzuweisen. Mit steigender AgNOR-Anzahl pro Zellkern fallen die relativen Zellkernanzahlen stark ab.

Anders stellt sich das Bild bei östrogen-negativen Zellen dar. Der größte Anteil der Zellen hat drei AgNORs im Zellkern. Weitere große Anteile werden von den östrogen-negativen Zellen mit zwei und vier AgNORs im Zellkern gestellt.

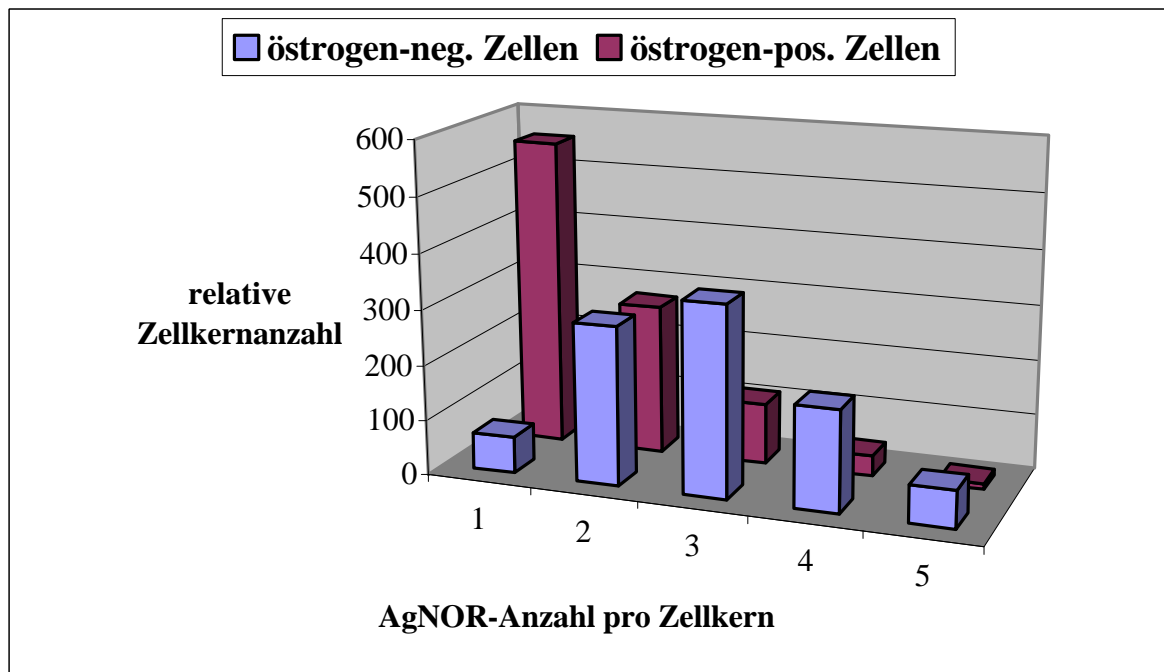


Abb. 8: Relative Zellkernanzahlen mit n AgNORs pro Zellkern ($n=1;2;3;4;5$) bei östrogen-negativen und östrogen-positiven Zellen.

4.2.2 AgNOR-Flächen

In Tabelle 8 sind verschiedene flächenbeschreibende AgNOR-Parameter getrennt für östrogen-positive und östrogen-negative Zellen angegeben. Auch hier wird deutlich, daß bei allen Merkmalen hochsignifikante Unterschiede zwischen beiden Zellgruppen bestehen.

AgNORs in östrogen-positiven Zellen haben größere Flächen und Flächenanteile als AgNORs in östrogen-negativen Zellen.

Ein wichtiges Maß zur Beschreibung von AgNOR-Mengen ist die mittlere AgNOR-Summenfläche pro Zellkern (S_AREA_M). Der signifikante Unterschied dieser AgNOR-Summenflächen zwischen östrogen-positiven und östrogen-negativen Zellen ist in Abbildung 9 dargestellt. Demnach haben die AgNORs in östrogen-negativen Zellen eine etwas geringere Summenfläche. Jedoch steht dieses Ergebnis auf den ersten Blick im Widerspruch zu den höheren AgNOR-Anzahlen bei östrogen-negativen Zellen. Die möglichen Ursachen hierfür werden in Kapitel 5.5 ausführlich diskutiert.

Tab. 8: Mittelwert und Standardabweichung sowie Signifikanzniveau p (t -Test) der AgNOR-Flächenparameter

Merkmal	Mittelwert und Standardabweichung ($\bar{x} - s$)		Signifikanzniveau p (t -Test)
	Östrogen-neg. Zellen	Östrogen-pos. Zellen	
S_AREA_M AgNOR-Summenfläche pro Zellkern [μm^2]	3,69 \pm 1,11	4,80 \pm 1,65	0,0006
MAXNOR_M Fläche des größten AgNORs im Zellkern [μm^2]	1,15 \pm 0,43	3,48 \pm 1,44	0,0001
MEANAR_M Mittl. Fläche des Einzel-AgNORs [μm^2]	0,82 \pm 0,32	3,22 \pm 1,04	0,0001
AR_RAT_M S_AREA_M/Zellkernfläche [%]	69,85 \pm 15,60	91,22 \pm 24,39	0,0001
MN_RAT1_M MAXNOR_M/Zellkernfläche [%]	30,29 \pm 11,95	73,66 \pm 16,78	0,0001
MN_RAT2_M MAXNOR_M/S_AREA_M [%]	510,78 \pm 70,81	832,49 \pm 84,86	0,0001
SIZRAT_M MEANAR_M/Kernfläche [%]	22,61 \pm 9,53	64,17 \pm 15,48	0,0001

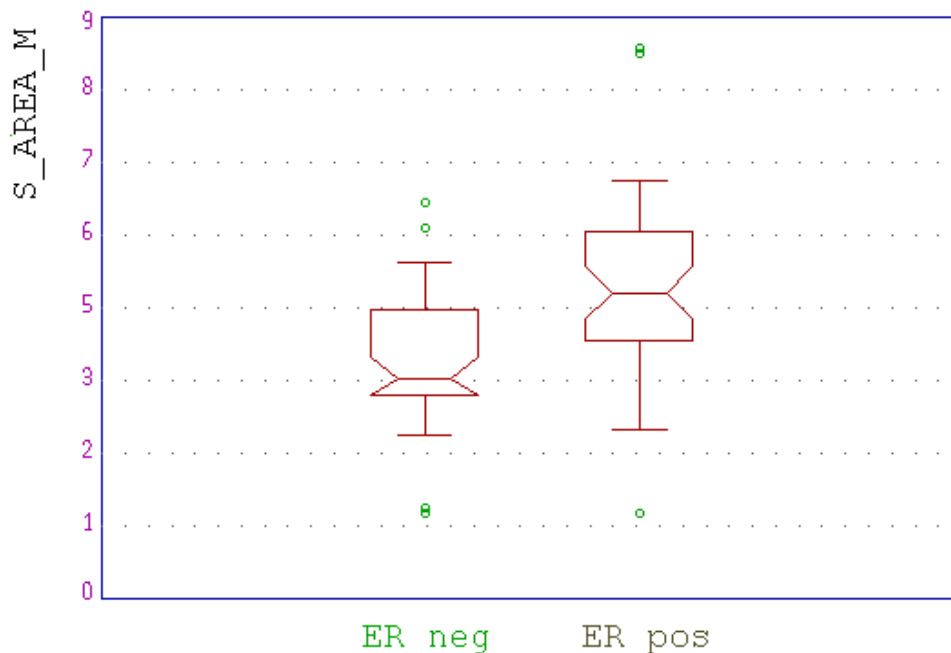


Abb. 9: Mittlere AgNOR-Summenfläche pro Zellkern (S_AREA_M) [μm^2] bei östrogen-negativen (ER neg) und östrogen-positiven (ER pos) Zellen.

Ein größerer Unterschied zwischen östrogen-positiven und östrogen-negativen Zellen besteht hinsichtlich der Fläche des größten AgNORs im Zellkern (MAXNOR_M). Wogegen bei östrogen-negativen Zellen die größten AgNORs eine mittlere Fläche von $1,15\mu\text{m}^2$ haben, erreichen bei östrogen-positiven Zellen die größten AgNORs mittlere Flächen von $3,48\mu\text{m}^2$. Diese Beziehung wird in Abbildung 10 dargestellt.

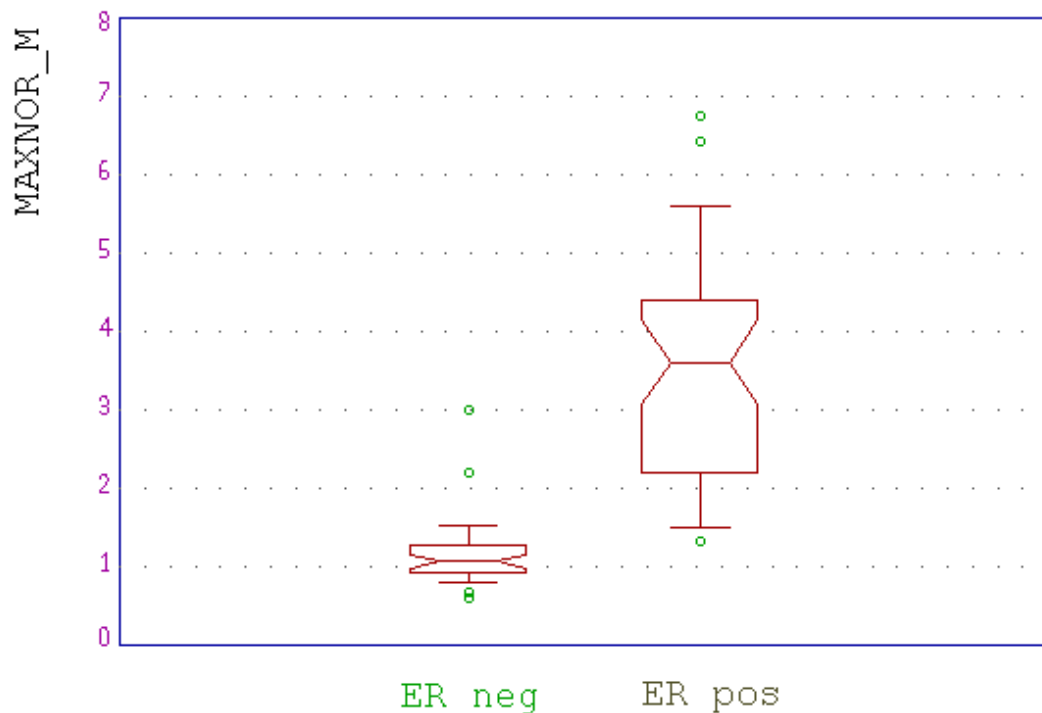


Abb. 10: Mittlere Flächen des größten AgNORs im Zellkern (MAXNOR_M) [μm^2] bei östrogen-negativen (ER neg) und östrogen-positiven (ER pos) Zellen.

Jedoch muß hier unterstrichen werden, daß vor allem im Fall der östrogen-positiven Zellen bei der MAXNOR_M-Flächenbestimmung keine Einzel-AgNORs, sondern AgNOR-Cluster gemessen werden, da die MAXNOR_M-Flächen zu groß sind, um nur einem AgNOR zu entsprechen.

Die methodischen Ursachen dafür haben einen sowohl optischen als auch meß-technischen Hintergrund (siehe Abschnitt 1.2; Seite 9-10). Bei der verwendeten vierhundertfachen Vergrößerung ist die Auflösung zu gering, um AgNOR-Cluster exakt in ihre Bausteine zu trennen. Im Mikroskopbild kommt es zu einem „Ineinanderfließen“ der Einzelstrukturen zu einem schwarzen Konglomerat.

Man kann also aus den sehr hohen MAXNOR_M-Werten schlußfolgern, daß es bei den östrogen-positiven Zellen des Mammakarzinoms zu einem besonderen Clusterungsphänomen kommt.

Die anderen AgNOR-Flächenmerkmale spiegeln letztendlich die gleichen Zusammenhänge wider, die anhand der AgNOR-Summenflächen und der Flächen des größten AgNORs erläutert wurden.

Eine weitere interessante Beziehung zeigt sich jedoch, wenn man die mittleren AgNOR-Summenflächen pro Zellkern (S_AREA_M) gegen die mittlere korrigierte AgNOR-Anzahl pro Zellkern (NORNBC_M) aufträgt. In Abbildung 11 wird deutlich, daß sich anhand dieser beiden Parameter die Punktmengen für östrogen-positive und östrogen-negative Zellen „sauber“ trennen lassen. Weder mit der AgNOR-Summenfläche noch der korrigierten AgNOR-Anzahl allein ist diese Separation zu vollziehen.

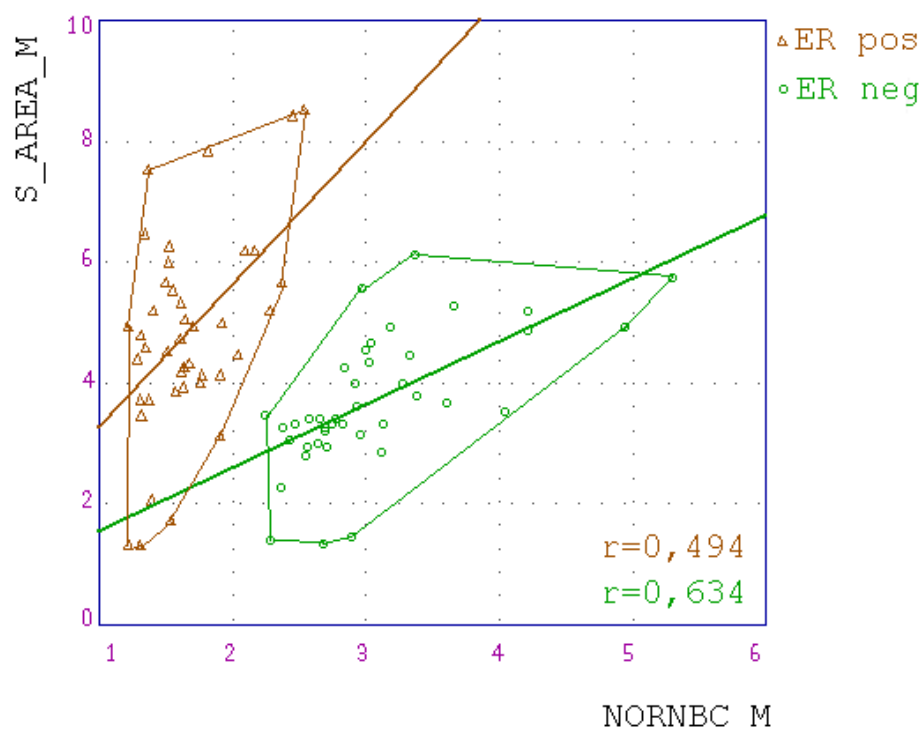


Abb. 11: Korrelation zwischen der mittleren AgNOR-Summenfläche pro Zellkern (S_AREA_M) [μm^2] und der mittleren korrigierten AgNOR-Anzahl pro Zellkern (NORNBC_M) aufgeschlüsselt nach östrogen-positiven (ER pos) und östrogen-negativen (ER neg) Zellen.

4.2.3 AgNOR-Lage

Wie aus Tabelle 9 ersichtlich ist, unterscheiden sich östrogen-positive und östrogen-negative Zellen auch hinsichtlich ihrer Lokalisation im Zellkern.

Tab. 9: Mittelwert und Standardabweichung sowie Signifikanzniveau p (t -Test) der AgNOR-Lageparameter.

Merkmal	Mittelwert und Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$)		Signifikanzniveau p (t -Test)
	Östrogen-neg. Zellen	Östrogen-pos. Zellen	
CENTER_M Anzahl zentraler AgNORs im Zellkern	0,29 \pm 0,12	0,27 \pm 0,09	0,4415
CENT_R_M Anteil zentraler AgNORs an korrr. AgNOR-Anzahl [%]	101,78 \pm 35	203 \pm 73,55	0,0001
BORDER_M Anzahl randständiger AgNORs pro Zellkern	1,70 \pm 0,47	0,74 \pm 0,29	0,0001
BORD_R_M Anzahl randständiger AgNORs an korrr. AgNOR-Anzahl [%]	537,34 \pm 81,93	408,51 \pm 119,07	0,0001
LOCAT_M AgNOR-Abstand vom Zentrum der Ellipse [μm^2]	0,66 \pm 0,04	0,57 \pm 0,08	0,0001
MDIST_M Abstand der AgNORs zueinander [μm^2]	0,485 \pm 0,03	0,52 \pm 0,05	0,0001
MAXDIS_M Max. Abstand zweier AgNORs [μm^2]	0,62 \pm 0,05	0,56 \pm 0,05	0,0001

Diese Lagemerkmale müssen jedoch im Gesamtzusammenhang beurteilt werden.

Der Anteil zentraler AgNORs an der korrigierten AgNOR-Anzahl pro Zellkern (CENT_R_M) ist bei östrogen-positiven Zellen ungefähr doppelt so groß wie bei östrogen-negativen Zellen.

Einerseits bestätigen diese Zahlen den Erfahrungswert, daß sich die beschriebenen Cluster bei östrogen-positiven Zellen meist im Zentrum des Zellkerns befinden. Andererseits besitzt der größte Anteil der östrogen-positiven Zellen aber nur ein AgNOR beziehungsweise ein AgNOR-Cluster (siehe Abbildung 6), womit der Vergleichswert im Nenner des CENT_R_M-Quotienten minimiert wird und der Quotient selbst größer wird.

Ein weiterer Unterschied zwischen östrogen-positiven und östrogen-negativen Zellen liegt in der mittleren Anzahl randständiger AgNORs pro Zellkern (BORDER_M). Östrogen-negative Zellen haben deutlich mehr randständige AgNORs als östrogen-positive Zellen.

Die Ursache dafür liegt natürlich einmal in der erhöhten AgNOR-Anzahl in östrogen-negativen Zellen (siehe Abbildung 6). Die erhöhten Anzahlen randständiger AgNORs bei östrogen-negativen Zellen belegen ihrerseits den Erfahrungswert, daß die AgNORs in diesen Zellen in geringerem Umfang zu einer Clusterung neigen und eher über den Zellkern verteilt angeordnet sind.

4.3 DAS VERHALTEN DER VARIATIONSKOEFFIZIENTEN AUSGEWÄHLTER AgNOR-MERKMALE

Die Variationskoeffizienten wichtiger AgNOR-Merkmale geben nicht nur Einblick in die Reproduzierbarkeit der Methode, sondern auch in die Variabilität der Meßwerte [ÖFNER et al. 1995c]. Diese Variationskoeffizienten sind relativ unabhängig von den in Kapitel 1.3.5 beschriebenen Störgrößen. Jedoch ist ihre biologische Bedeutung bis heute nicht ausreichend untersucht.

Zur Bestimmung der Variationskoeffizienten CV wurden die beiden „klassischen“ AgNOR-Merkmale (AgNOR-Anzahl und AgNOR-Summenfläche) sowie die mittlere Fläche des größten AgNORs, welche den größten Unterschied zwischen östrogen-positiven und östrogen-negativen Tumorzellen zeigte, ausgewählt. Zur Berechnung sind jeweils die Standardabweichung S und der Mittelwert \bar{x} notwendig ($CV = S / \bar{x}$).

In Tabelle 10 werden die Variationskoeffizienten getrennt für östrogen-positive und östrogen-negative Zellen sowie das Signifikanzniveau dargestellt. Zwischen östrogen-negativen und östrogen-positiven Zellen bestehen hochsignifikante Unterschiede hinsichtlich der CV_{NORNBC} und CV_{MAXNOR} .

Tab. 10: Mittelwert und Standardabweichung sowie Signifikanzniveau p (t -Test) der Variationskoeffizienten (CV) ausgewählter AgNOR-Lageparameter.

Merkmal	Mittelwert und Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$)		Signifikanzniveau p (t -Test)
	Östrogen-neg. Zellen	Östrogen-pos. Zellen	
CV_{NORNBC} Variationskoeffizient der mittl. korr. AgNOR-Anzahl	0,505 \pm 0,097	0,382 \pm 0,139	0,0001
CV_{SAREA} Variationskoeffizient der mittl. Summenfläche der AgNORs	0,350 \pm 0,103	0,376 \pm 0,094	0,2390
CV_{MAXNOR} Variationskoeffizient der mittl. Fläche des größten AgNORs	0,377 \pm 0,134	0,515 \pm 0,116	0,0001

4.4 BEZIEHUNGEN ZWISCHEN AgNOR-AUSSTATTUNG UND ÖSTROGENREZEPTORSTATUS DES TUMORS

Es wurde hier versucht herauszufinden, ob es Beziehungen zwischen den AgNOR-Parametern und dem Östrogenrezeptorstatus gibt. Als beschreibende Merkmale des Östrogenrezeptorstatus wurden die Ergebnisse des Estrogen-Receptor-Immuno-Cytochemical-Assay (ER-ICA) und des Enzym-Immuno-Assay (EIA) sowie das Befundergebnis „östrogen-positiver Tumor“ oder „östrogen-negativer Tumor“ untersucht.

Bei Betrachtung des Gesamttumors demonstrieren beide Kategorien ihre Unabhängigkeit. Wird jedoch bei der Darstellung wiederum zwischen östrogen-positiven und östrogen-negativen Tumorzellen unterschieden, tritt eine weitere wichtige Beziehung hervor.

In Abbildung 12 werden die mittlere korrigierte AgNOR-Anzahl pro Zellkern (NORNBC_M) und die Ergebnisse des Estrogen-Receptor-Immuno-Cytochemical-Assay (ER-ICA) für den Gesamttumor, für östrogen-negative und östrogen-positive Zellen dargestellt.

Für den Gesamttumor zeigt sich eine relativ schwache inverse Korrelation ($r = -0,289$) bei einer relativ hohen Streuung der Meßwerte. Betrachtet man nun die östrogen-negativen Zellen allein, so wird der Zusammenhang zwischen AgNOR-Anzahl und Östrogenpositivität des Gesamttumors deutlicher ($r = -0,653$). Je positiver der Tumor hinsichtlich seiner Östrogenrezeptoren, desto weniger AgNORs sind in den Zellkernen östrogen-negativer Zellen vorhanden. Die AgNOR-Anzahlen bei östrogen-positiven Zellen bleiben von den Ergebnissen des ER-ICA völlig unbeeinflusst ($r = -0,008$).

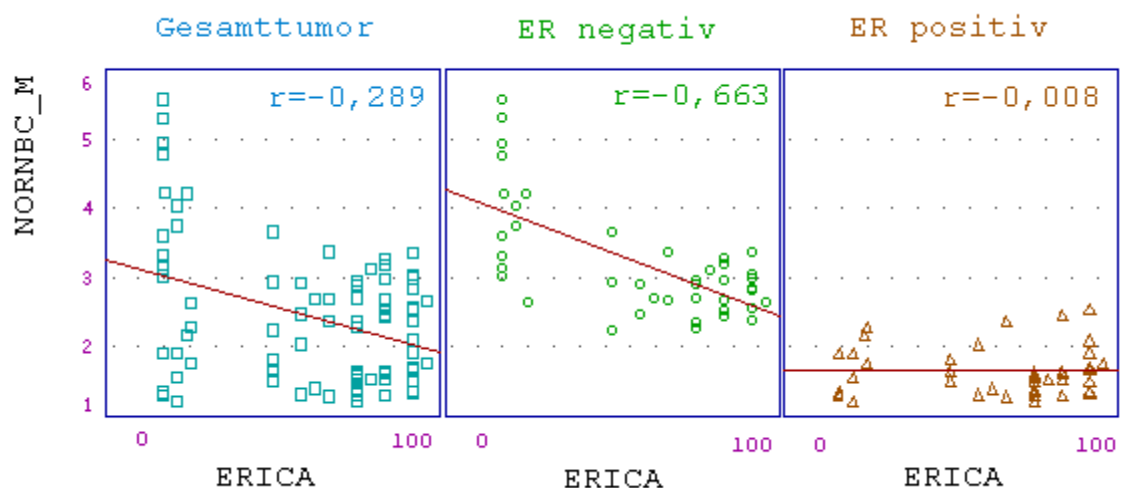


Abb. 12: Korrelation zwischen der mittleren korrigierten AgNOR-Anzahl pro Zellkern (NORNBC_M) und den Ergebnissen des Estrogen-Receptor-Immuno-Cytochemical-Assay (ERICA) [%] dargestellt für den Gesamttumor (links), für östrogen-negative (Mitte) und östrogen-positive Zellen (rechts).

Ein anderes Bild stellt sich beim Vergleich der mittleren Anschnittsflächen des größten AgNORs im Zellkern (MAXNOR_M) mit den Ergebnissen des Estrogen-Receptor-Immuno-Cytochemical-Assay (ER-ICA) in Abbildung 13 dar.

Für den Gesamttumor besteht zwischen den Flächen des größten AgNORs und den Ergebnissen des ER-ICA eine Korrelation von $r = 0,352$. Sowohl bei östrogen-negativen ($r = 0,420$) als auch bei östrogen-positiven Zellen ($r = 0,490$) zeigen sich einzeln betrachtet höhere Korrelationen, wenn auch auf unterschiedlichem Niveau. Grundsätzlich steigt bei beiden Zellfraktionen mit zunehmender Positivität des Gesamttumors auch die Fläche des größten AgNORs beziehungsweise des größten AgNOR-Clusters im Tumorzellkern.

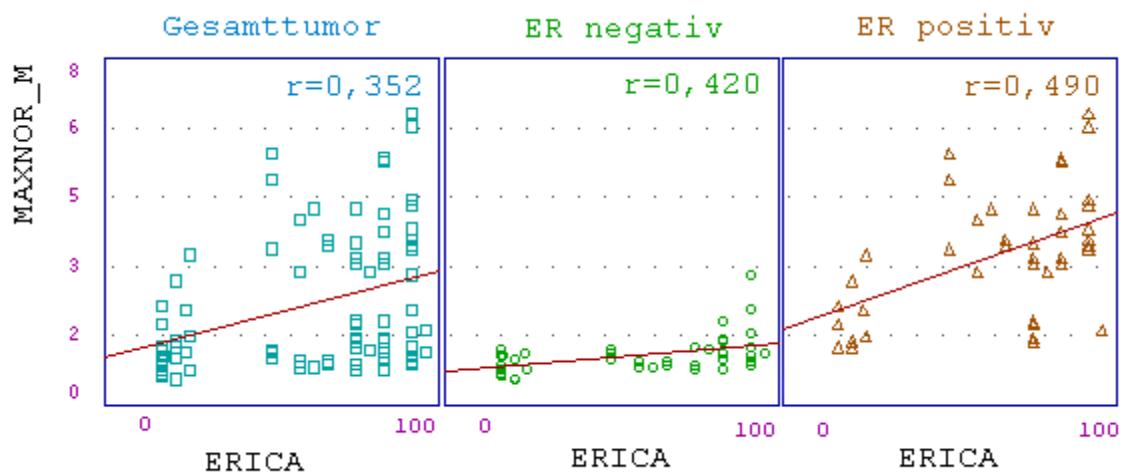


Abb. 13: Korrelation zwischen der mittleren Anschnittsfläche des größten AgNORs im Zellkern (MAXNOR_M) [μm^2] und den Ergebnissen des Estrogen-Receptor-Immuno-Cytochemical-Assay (ERICA) [%] dargestellt für den Gesamttumor (links), für östrogen-negative (Mitte) und östrogen-positive Zellen (rechts).

4.5 BEZIEHUNGEN ZWISCHEN AgNOR-MERKMALEN UND ANDEREN MALIGNITÄTSKRITERIEN

Im folgenden wurde untersucht, welche Beziehungen zwischen den aussagekräftigsten AgNOR-Merkmalen und weiteren Malignitätskriterien bestehen.

Zur Charakterisierung der Malignität lassen sich unter anderem das Kerngrading nach BLACK und ASIRE [1;2;3], das histopathologische Grading nach BLOOM und RICHARDSON [1;...;9] sowie die Mitoserate [Anzahl/10 Gesichtsfelder] und die immun-histochemisch bestimmte Wachstumsfraktion (Ki-67) [%] heranziehen.

In Tabelle 11 wurden die Malignitätskriterien den wichtigsten AgNOR-Parametern in einem Korrelationsplot gegenübergestellt. Bei den AgNOR-Merkmalen wurde jeweils zwischen „Gesamtumor“, „Östrogen-positiven Zellen“ und „Östrogen-negativen Zellen“ unterschieden. Für das Kerngrading und das BLOOM-RICHARDSON-Grading wurde jeweils der SPEARMAN'sche Korrelationskoeffizient r ermittelt, da es sich um Rangkorrelationen handelt. Für die Mitoserate und die Wachstumsfraktion wurde der PEARSON'sche Korrelationskoeffizient r berechnet.

Grundsätzlich bestehen nur bei der mittleren korrigierten AgNOR-Anzahl pro Zellkern (NORNBC_M) und der AgNOR-Summenfläche pro Zellkern (S_AREA_M) nennenswerte Beziehungen zu den Malignitätskriterien. Die mittlere Fläche des größten AgNORs im Zellkern (MAXNOR_M) scheint hier von geringerem Wert zu sein.

Augenscheinlich ist vor allen Dingen, daß die größten Korrelationen sowohl bei der mittleren korrigierten AgNOR-Anzahl pro Zellkern (NORNBC_M) als auch bei der AgNOR-Summenfläche pro Zellkern (S_AREA_M) ausschließlich in der Kategorie „Östrogen-negative Zellen“ auftreten.

Tab. 11: Korrelation zwischen AgNOR-Merkmalen (bezogen auf „Gesamtumor“, „Östrogen-positiven Zellen“ und „Östrogen-negative Zellen“) und anderen histopathologischen Malignitätskriterien.

Korrelationskoeffizient		SPEARMAN's r		PEARSON's r	
Merkmal		Kern-Grading	BLOOM-RICHARDSON Grading	Mitoserate	Wachstumsfraktion (Ki-67)
NORNBC_M korrigierte AgNOR-Anzahl pro Zellkern	Gesamtumor	0,186	0,132	0,186	0,221
	Östr.-neg. Zellen	0,249	0,328	0,313	0,286
	Östr.-pos. Zellen	0,191	0,024	-0,010	0,002
S_AREA_M AgNOR-Summenfläche pro Zellkern	Gesamtumor	0,069	0,102	-0,025	0,084
	Östr.-neg. Zellen	0,226	0,283	0,238	0,270
	Östr.-pos. Zellen	0,091	0,054	-0,175	0,055
MAXNOR_M Fläche des größten AgNORs im Zellkern	Gesamtumor	-0,119	-0,064	-0,150	-0,048
	Östr.-neg. Zellen	-0,118	-0,115	0,023	0,012
	Östr.-pos. Zellen	-0,033	0,011	-0,231	0,110

Aus den vorliegenden Daten läßt sich schlußfolgern, daß mit größeren AgNOR-Anzahlen und AgNOR-Summenflächen in östrogen-negativen Zellen auch die Malignität des Gesamtumors wächst. Umgekehrt sind in östrogen-negativen Zellen hochmaligner Karzinome größere AgNOR-Anzahlen und Summenflächen zu erwarten.

Exemplarisch sollen hier noch einmal zwei Zusammenhänge herausgegriffen werden.

Abbildung 14 zeigt das Verhalten der mittleren korrigierten AgNOR-Anzahl pro Zellkern (NORNBC_M) gegenüber dem BLOOM-RICHARDSON-Grading. Auffällig ist der prägnante Anstieg der mittleren AgNOR-Anzahlen mit steigenden Punktwerten für das Grading bei östrogen-negativen Zellen ($r = 0,328$). Die AgNOR-Anzahlen bei östrogen-positiven Zellen bleiben dagegen unverändert ($r = 0,024$).

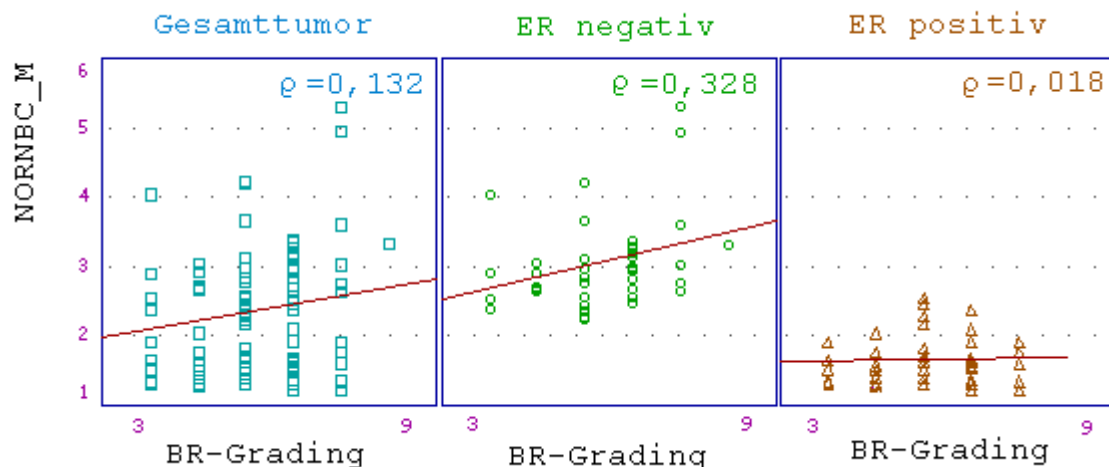


Abb. 14: Korrelation zwischen der mittleren korrigierten AgNOR-Anzahl pro Zellkern (NORNBC_M) und dem BLOOM-RICHARDSON-Grading (BR-Grading) [1;...;9] dargestellt für den Gesamtumor (links), für östrogen-negative (Mitte) und östrogen-positive Zellen (rechts).

Ähnlich stellt sich in Abbildung 15 die Beziehung zwischen den mittleren AgNOR-Summenflächen pro Zellkern (S_AREA_M) und dem BLOOM-RICHARDSON-Grading dar. Östrogen-negative Zellen hochmaligner Tumoren haben größere AgNOR-Summenflächen als östrogen-negative Zellen bei Tumoren niedriger Malignität ($r = 0,283$). Bei östrogen-positiven Zellen ist wiederum kein Trend erkennbar ($r = 0,054$).

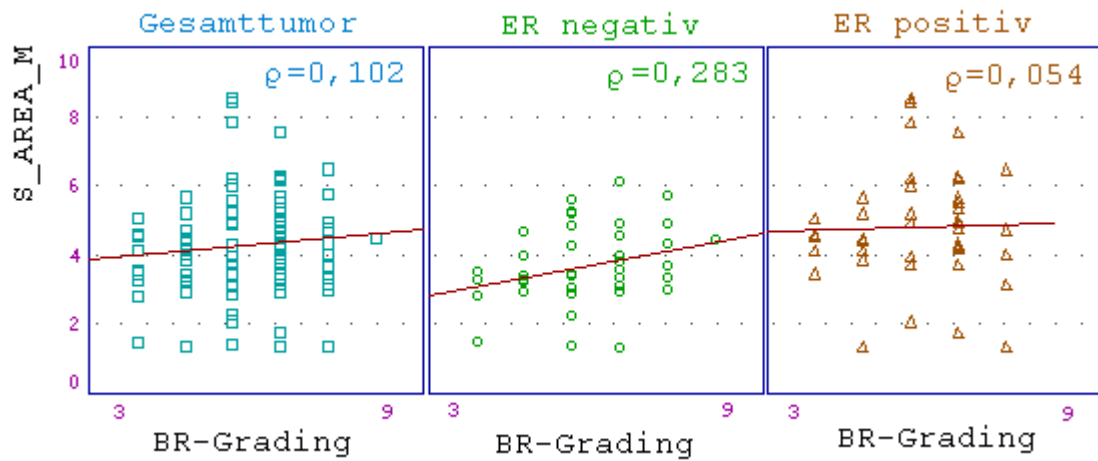


Abb. 15: Korrelation zwischen der mittleren AgNOR-Summenfläche pro Zellkern (S_AREA_M) [μm^2] und dem BLOOM-RICHARDSON-Grading (BR-Grading) [1;...;9] dargestellt für den **Gesamtumor** (links), für **östrogen-negativ** (Mitte) und **östrogen-positiv** Zellen (rechts).

5 DISKUSSION

5.1 STELLENWERT VON AgNORs UND ÖSTROGENREZEPTORSTATUS

Die Prognoseeinschätzung von Tumorkrankheiten ist wesentliche Voraussetzung für eine optimale Therapie. Dazu können sowohl klinische als auch pathohistologische Kriterien herangezogen werden. Jedoch können auch heute selbst durch kombiniertes Betrachten der Prognosefaktoren nur grobe Einschätzungen über den weiteren Krankheitsverlauf gegeben werden. So ist auch eine Verbesserung der Prognoseeinschätzung beim Mammakarzinom notwendig.

Der sich daraus ableitende Anspruch an die Forschung besteht einerseits in der Suche nach neuen aussagekräftigen Prognoseindikatoren und andererseits in deren Validierung und dem Prädiktivitätsnachweis bereits bekannter putativer Kriterien durch den Vergleich mit verlässlichen Parametern, insbesondere jedoch durch Korrelation mit der Rezidivwahrscheinlichkeit oder Überlebenszeit.

Seit der Etablierung einer verbesserten Färbetechnik durch PLOTON et al. 1986 werden AgNORs als Prognosemarker zunehmend interessant. Die große Anzahl von Studien über die Bedeutung von AgNOR-Parametern bei verschiedenen Organtumoren in den letzten Jahren belegt die Aktualität der Problematik [MARTIN et al. 1991]. AgNOR-Merkmale kennzeichnen in erster Linie das Proliferationsverhalten von Tumoren [MARTIN 1994]. Standardarbeiten auf diesem Gebiet bewiesen einen engen Zusammenhang zwischen AgNOR-Mengen und Proliferationsraten verschiedener Organtumoren [DERENZINI et al. 1989b und 1990]. Ebenfalls sind Hinweise auf die Zelldifferenzierung nachweisbar [REEVES et al. 1984].

AgNORs sind bis heute in der Regel nicht Bestandteil der Routinetumordiagnostik des Pathologen. Die Ursachen dafür sind vielfältig.

Die anfänglich fehlende Standardisierung der Methode im Färbe- und Auswertungsprozeß führte einerseits zu heterogenen Daten innerhalb einer Untersuchungsserie und andererseits zu einer fehlenden Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen verschiedenen Arbeitsgruppen. Das „International Committee on AgNOR-Quantitation“ formuliert deshalb seit 1994 Richtlinien zur standardisierten AgNOR-Analyse [AUBELE et al. 1994b].

AgNOR-Mengen können durch eine Vielzahl von Parametern beschrieben werden. Obwohl AgNOR-Anzahlen und AgNOR-Summenflächen diejenigen Parameter sind, welche mit den Tumorproliferationsraten korrelieren [DERENZINI et al. 1989b und 1990], steht der Nachweis prognostischer Prädiktivität noch aus. Ein Zusammenhang zur Prognose des Mammakarzinoms hinsichtlich Überlebenszeit und metastasenfreiem

Intervall konnte bisher nur für die Variationskoeffizienten der eigentlichen AgNOR-Parameter nachgewiesen werden [AUBELE et al. 1994a].

Der Östrogenrezeptorstatus ist ein Routineparameter bei der Beurteilung des Mammakarzinoms. Praktisch hilft der Östrogenrezeptorstatus bei der Auswahl der Patientinnen, denen eine endokrine Therapie von Nutzen sein kann [BLOOM et al. 1980]. Die Expression von Östrogenrezeptoren ist grundsätzlich ein Merkmal für höhere Tumordifferenzierung [REMMELE et al. 1986] und gibt Hinweise auf eine bessere Prognose [ALLEGRA et al. 1979].

5.2 MATERIAL UND FÄRBETECHNIK

Als Untersuchungsmaterial wurde in Form von Paraffinblöcken archiviertes Gewebe von Mammakarzinomen gewählt. Durch die Ausschlußkriterien schrumpfte die Anzahl der verfügbaren Fälle letztendlich auf 49.

Hinsichtlich des histologischen Tumortyps entsprechend der WHO-Klassifikation [WHO 1982] wurden ausschließlich duktale und lobuläre Mammakarzinome verschiedener histopathologischer Differenzierung einbezogen, um die Frage an einem homogenen Material zu untersuchen und damit die Aussagefähigkeit zu erhöhen. Diese beiden Tumortypen bilden zusammengerechnet ungefähr 87% aller bösartigen Mammatumoren.

Die Färbungen für Östrogenrezeptoren und AgNORs sind etablierte Methoden in den histologischen Labors des Instituts für Pathologie der Charité.

Die Östrogenrezeptorfärbung ist eine immunhistochemische Methode und bedient sich monoklonaler Antikörper gegen die Rezeptoren. Seit einigen Jahren besteht die Möglichkeit der Anwendung am Paraffinschnitt. Dazu ist jedoch eine Antigen-demaskierung mit Hilfe von Enzymen oder durch Autoklavieren der Präparate notwendig.

Die moderne AgNOR-Färbung wird nach der Methode von PLOTON et al. 1986 und der Modifizierungen von ÖFNER et al. 1994 am Paraffinschnitt durchgeführt. Dabei werden die argyrophilen Strukturproteine der Nukleolus-organisierenden Regionen in einem Ein-Schritt-Verfahren versilbert. Für einen kräftigen Färbeerfolg ist auch hier ein Autoklavieren der Proben erforderlich.

Das methodische Ziel lag in einer sinnvollen und reproduzierbaren Verbindung beider Färbemethoden zu einer Simultanfärbung.

Leider konnte dabei kaum auf Erfahrungen anderer Arbeitsgruppen zurückgegriffen werden. Die Kombination von immunhistochemischen Methoden und anderen Markierungstechniken zur Darstellung unterschiedlicher malignitätsassoziierter Marker in einzelnen Tumorzellen ist eine relativ neue Idee der pathohistologischen Forschung [HAROSKE et al. 1996a]. Es existiert eine begrenzte Anzahl von Arbeiten, welche eine Doppelfärbung von Wachstumsfraktion (Ki-67) mit dem paraffingängigen Antikörper MIB1 und AgNORs ausprobierten [MUNAKATA et al. 1994; HAROSKE et al. 1996b]. Grundsätzlich ist dieses Vorgehen analog zu unserer Aufgabenstellung eine Verbindung von Immunhistochemie und Versilberung. Als Modell für unsere Färbung konnten die entsprechenden Arbeiten jedoch nicht agieren, da entweder veraltete Färbeschemata verwendet wurden [MUNAKATA et al. 1994], keine Hinweise auf die Färbemethodik gegeben wurden [MOURAD et al. 1994] oder entsprechende Untersuchungen zum Zeitpunkt noch nicht vorlagen [BIGRAS et al. 1996].

In entsprechenden Vortests wurde die Abhängigkeit des Färbeergebnisses von der Reihenfolge der Färbungen untersucht. Immunhistochemische Färbungen sind empfindlich gegenüber vielerlei Einflüssen. Das farbige Reaktionsprodukt reagiert nach unseren Erfahrungen zum Beispiel auf eine aufsteigende Alkoholreihe mit einem deutlichen Verbleichen. War der pH-Wert des Zitratpuffers, der zum Autoklavieren verwendet wird, nicht exakt auf 6,0 eingestellt, mußten starke Sensitivitätseinbußen in Kauf genommen werden. Die ersten Testpräparate wurden deshalb zuerst versilbert und nachfolgend immunhistochemisch behandelt, um das empfindliche Farbreaktionsprodukt der Immunfärbung zu schützen. Entgegen unserer Hypothese zeigten sich bei dieser Abfolge nur schwache und blasse Farben. Wahrscheinlich werden durch die Chemikalien der Versilberungsreaktion entweder die Epitope des primären Anti-Östrogenrezeptor-Antikörper alteriert oder das farbige Reaktionsprodukt chemisch umgesetzt. Wurde die Östrogenrezeptorfärbung zuerst durchgeführt, erhielt sich eine kräftige Rotfärbung auch über die AgNOR-Reaktion hinaus. Somit wurde diese Variante für die Färbung der Präparate eingesetzt. Die AgNOR-Markierung selbst zeigte sich von der Reihenfolge der Färbungen mikroskopisch unbeeinflusst.

Der Fixierungs- und Einbettungsprozeß in Paraffin hat für Gewebe verschiedene Konsequenzen. Einerseits zeigt sich im Vergleich zum Gefrierschnitt eine deutlich verbesserte Histomorphologie. Andererseits kommt es zu einem beträchtlichen Sensitivitätsverlust für alle immunhistochemischen Protein- und Rezeptornachweise. Die Ursache dafür scheint in einer Veränderung der Oberflächenstruktur der betroffenen Proteine durch Fixierung und Einbettung zu liegen. Der Anti-Rezeptor-Antikörper „findet“ folglich sein Epitop nicht mehr. Ein ähnlicher Prozeß scheint sich bei den AgNOR-Proteinen abzuspielen, denn die Silberimprägnationen fallen bei Paraffinschnitten grundsätzlich schwächer aus. Unabhängig voneinander beschrieben Arbeitsgruppen die Demaskierung der alterierten Proteinstrukturen durch reine Energiezufuhr zum Beispiel mit Hilfe des Autoklavierens für die Immunhistochemie [BIER et al. 1995] und auch für die Versilberung [ÖFNER et al. 1994]. Da also für beide Teilfärbungen ein Autoklavieren erforderlich ist, wurde dieser Arbeitsschritt nur einmal vor Durchführung beider Färbungen angewendet.

Um ein möglichst reproduzierbares Färbeergergebnis zu erhalten, wurde eine weitgehende Standardisierung des Färbeablaufs gewährleistet. Für die AgNOR-Färbung wurden die Richtlinien des „International Committee on AgNOR-Quantification“ [AUBELE et al. 1994b] umgesetzt. Es wurde nach abgeschlossener Östrogenrezeptorfärbung für einen unmittelbaren Anschluß der AgNOR-Färbung gesorgt. Während des gesamten Färbesyklus wurden die gleichen Materialien verwendet. Die im Färbeprotokoll angegebenen Zeitfaktoren wurden strikt eingehalten.

5.3 MEßMETHODIK

Die digitale Bildanalyse ist die Methode der Wahl zur Quantifizierung von AgNOR-Mengen [AUBELE et al. 1994b]. Neben Präzision und hoher Reproduzierbarkeit bietet sie die Möglichkeit der Erfassung einer ganzen Reihe von beschreibenden AgNOR-Parametern. Die AgNOR-Konfiguration läßt sich durch Anzahl-, Flächen-, und Lageparameter charakterisieren. Praktisch wichtig sind vor allem AgNOR-Flächenparameter, da sie gut reproduzierbar sind und unabhängig von verschiedenen Färbe- und Meßeinflußfaktoren einen Ergebnisvergleich verschiedener Arbeitsgruppen ermöglichen, insbesondere wenn sie relativ betrachtet werden. Das ist ein weiterer entscheidender Vorteil im Vergleich zur Zählmethode, wo nur AgNOR-Anzahlen mit dem Auge des Untersuchers ermittelt werden können. Doch selbst diese Zählung wird von der Erfahrung des Untersuchers beeinflußt, hat also eine subjektive Komponente.

Seit 1989 werden im Labor für Automatisierte Mikroskopbildanalyse des Instituts für Pathologie der Charité AgNORs mit dem Bildverarbeitungssystem AMBA vermessen. Jedoch wurden alle Messungen bisher an einem Schwarz-Weiß-System durchgeführt. Im Schwarz-Weiß-Bild des Monitors sind östrogen-positive und östrogen-negative Zellen nicht voneinander zu unterscheiden. Deshalb wurde die Problemstellung mit dem Farb-Bildverarbeitungssystem AMBA gelöst.

Die Darstellung des histologischen Bildausschnitts als Farbbild ermöglicht eine einfache Separation von östrogen-positiven und östrogen-negativen Zellen. Als problematisch stellte sich zunächst die Zellkernsegmentierung heraus. Das Segmentieren ist ein Verfahren der Bildanalyse, welches dem Rechner ermöglicht, ein gewähltes Objekt auch zu „erkennen“, also aus dem Bildzusammenhang zu segmentieren. Für die Segmentierung sind spezielle Merkmale des Objektes nötig. Zur Zellkernsegmentierung lassen sich geometrische (Form; Größe) und densitometrische (Extinktionen) Parameter sowie Texturmerkmale und die Farbe heranziehen. Das Farbbild bot jedoch nur suboptimale Bedingungen zur Segmentierung der „zartgelben“ östrogen-negativen Zellen. Dieses Farbbild besteht aus drei Teilbildern (Rot-; Grün-; Blaubild), welche jeweils in einem separaten Bildspeicher der Grafikkarte abgelegt werden. Alle Teilbilder wurden einzeln nach ihren Segmentierungsbedingungen überprüft. Im Grün-Bild zeigten östrogen-negative Zellen optimale Voraussetzungen. Die „roten“ östrogen-positiven Zellen wiesen im Grün-Bild einen noch hinreichend starken Kontrast auf.

Somit wurde das Grün-Bild für die Zellkernsegmentierung ausgewählt. Die gleichen Überlegungen führten für die AgNOR-Segmentierung zu einer Auswahl des Rot-Bildes. Dem Untersucher wird während des gesamten Meßablaufs das farbige Gesamtbild präsentiert.

Alle diese Erfahrungen wurden im Meßprogramm AMBA\color umgesetzt und mit dem vorhandenen AgNOR-Vermessungsprogramm kombiniert. Mit dem Programm AMBA\color ist es möglich, AgNORs in beliebig verschiedenfarbig markierten Zellkernen zu vermessen. Dabei konnte ein optimales Verhältnis zwischen Automatisierung des Meßprozesses und sinnvoller Interaktivität hergestellt werden.

5.4 GEGENSEITIGE BEEINFLUSSUNG DER FÄRBEMETHODEN

Ein zentraler Teil dieser Studie bestand in der Untersuchung der Frage, ob sich Östrogenrezeptormarkierung und AgNOR-Färbung beeinflussen. Dabei war theoretisch sowohl ein Einfluß der Rezeptorfärbung auf das AgNOR-Färbeergebnis als auch umgekehrt eine Veränderung der Östrogenrezeptormarkierung durch die AgNOR-Versilberungsreaktion zu untersuchen.

Um einen möglichen gegenseitigen Einfluß nachzuweisen, wurden serielle Schnitte von zehn Testfällen mit den jeweiligen Einzelfärbungen und der Simultanfärbung behandelt und nachfolgend im Vergleich untersucht.

Zuerst wurde die AgNOR-Ausstattung von Tumorzellen von Präparaten mit Simultanfärbung und mit einzelner AgNOR-Färbung am Bildanalysesystem bestimmt. Weder hinsichtlich der AgNOR-Anzahlen noch der AgNOR-Summenflächen zeigten sich signifikante Unterschiede. Es konnte somit geschlußfolgert werden, daß die AgNOR-Darstellung durch die zusätzliche Östrogenrezeptormarkierung nicht beeinflußt wird. AgNORs in immunhistochemisch markierten Zellen sind also im Vergleich zu den AgNORs in allein versilberten Präparaten unverändert.

MUNAKATA et al. 1994 versuchten ebenfalls eine kombinierte Färbemethode für immunhistochemische und AgNOR-Markierungen zu etablieren. Anstatt der Östrogenrezeptoren wurde das Ki-67-Antigen dargestellt. Die Untersuchung der gegenseitigen Beeinflussung der Färbemethoden wurde weitgehend analog zur hier angewandten Methode durchgeführt. Jedoch zeigten sich hinsichtlich der AgNOR-Flächen hochsignifikante Unterschiede zwischen einerseits simultan Ki-67- und AgNOR-gefärbten Zellen und andererseits einzeln AgNOR-markierten Zellen. Die mittleren AgNOR-Flächen pro Zellkern waren bei simultan gefärbten Zellen deutlich größer. Keinen signifikanten Unterschied gab es beim Vergleich der mittleren AgNOR-Anzahlen. Es besteht jedoch kein Widerspruch zu unseren Ergebnissen. MUNAKATA et al. 1994 verwendeten zur Antigendemaskierung der Ki-67-Epitope im Paraffinschnitt eine Mikrowellenbestrahlung. Diese Technik wurde zwangsläufig bei der Simultanfärbung,

jedoch nicht bei den einzeln AgNOR-gefärbten Vergleichspräparaten angewendet. Man schlußfolgerte aus den Ergebnissen, daß die obligatorische Mikrowellenbestrahlung zur Ki-67-Markierung die AgNOR-Darstellung deutlich beeinflußt und somit die AgNOR-Flächenparameter bei der Simultanfärbung nicht direkt reproduzierbar sind. Wir wissen heute, daß Energiezufuhr durch Mikrowellenbestrahlung oder Autoklavieren auch die Sensitivität der AgNOR-Methode erhöht. Das ist ein sogar erwünschter und angestrebter Effekt. Deshalb gehört das Autoklavieren der Präparate heute zum Standardfärbeschema der AgNOR-Reaktion [ÖFNER et al. 1994]. Wird die gleiche Antigendemaskierungstechnik in einem standardisierten Ablauf bei simultan gefärbten Präparaten und einzeln AgNOR-markierten Vergleichspräparaten angewendet, so lassen sich nach den vorliegenden Ergebnissen keine Unterschiede in der AgNOR-Darstellung feststellen.

Der mögliche Einfluß der AgNOR-Reaktion auf die Markierung der Östrogenrezeptoren wurde in einem zweiten Teil dieser Reproduzierbarkeitsstudie untersucht. Dazu wurden fünf östrogen-negative und fünf östrogen-positive Testfälle einerseits simultan gefärbt und andererseits nur mit der Rezeptorfärbung behandelt.

Bei den fünf östrogen-negativen Testfällen konnten auch nach durchgeführter Simultanfärbung keine östrogen-positiven Zellen nachgewiesen werden. Demnach führt die zusätzliche AgNOR-Reaktion zu keiner Sensitivitätserhöhung der Rezeptormarkierung. Bei den fünf östrogen-positiven Testfällen wurden in den simultan gefärbten und einzeln östrogen-markierten Präparaten die Anzahlen positiv markierter Zellen pro Gesichtsfeld mit einem Zählprogramm im Vergleich bestimmt. Auch hier gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Vergleichsgruppen. Das bedeutet, daß es durch die zusätzliche AgNOR-Reaktion auch zu keinem Sensitivitätsverlust kommt. Da die AgNOR-Reaktion zeitlich nach der Östrogenrezeptorfärbung durchgeführt wird, ist ein Einfluß auf die Spezifität der Östrogenrezeptormarkierung sehr unwahrscheinlich. Auch MUNAKATA et al. 1994 konnten keinen Einfluß der AgNOR-Reaktion auf die immunhistochemische Markierung feststellen.

Es wurde somit nachgewiesen, daß keine gegenseitige Beeinflussung von AgNOR-Reaktion und Östrogenrezeptorfärbung stattfindet. Damit waren Vermessungen von AgNORs in immunhistochemisch markierten Zellen methodisch gerechtfertigt.

5.5 UNTERSCHIEDE ZWISCHEN ÖSTROGEN-POSITIVEN UND ÖSTROGEN-NEGATIVEN ZELLEN

Im eigentlichen Meßteil dieser Studie wurden die AgNORs in Tumorzellen von 49 Mammakarzinomen am Bildverarbeitungssystem mit Hilfe des Programms AMBA\color vermessen. Die Meßdaten für östrogen-negative und östrogen-positive Zellen wurden dabei separat erfaßt und abgelegt. Der nachfolgende Vergleich beider Zellpopulationen zeigte hochsignifikante Unterschiede in vielen beschreibenden AgNOR-Parametern.

Östrogen-negative Zellen und östrogen-positive Zellen des Mammakarzinoms unterscheiden sich hinsichtlich ihrer **AgNOR-Anzahlen**. Dabei zeigen östrogen-negative Zellen deutlich höhere Anzahlen einzelner AgNORs. Der größte Anteil östrogen-negativer Zellen hat drei AgNORs im Zellkern. Dagegen weisen die meisten östrogen-positiven Zellen nur ein AgNOR oder AgNOR-Cluster auf. Große AgNOR-Anzahlen sind Merkmale von Zellen niedrigen Differenzierungsgrades [REEVES et al. 1984]. Die Korrelation zwischen AgNOR-Anzahlen und Tumorphiliferationsraten [DERENZINI et al. 1989b] kennzeichnet die östrogen-negativen Tumorzellen als stärker proliferierende Subpopulation. Umgekehrt weisen die niedrigeren AgNOR-Anzahlen bei östrogen-positiven Zellen auf eine geringere Proliferationstendenz und damit auch auf eine verbesserte Prognose.

Unterschiede bestehen ebenfalls bei den **AgNOR-Flächen**. Jedoch sind diese Ausdruck komplexer Zusammenhänge, welche durch die etablierten Parameter nur ungenügend beschrieben werden können. Die AgNOR-Summenfläche pro Zellkern bei östrogen-negativen Zellen sind zwar geringfügig, jedoch signifikant geringer als bei östrogen-positiven Zellen. Dies steht auf den ersten Blick im Widerspruch zu dem Ergebnis, daß östrogen-negative Zellen im Mittel höhere AgNOR-Anzahlen besitzen. Die Betrachtung weiterer Flächenparameter bietet jedoch ein Erklärungsmodell.

1. Die Flächen der einzeln liegenden AgNORs sind bei östrogen-negativen Zellen kleiner als bei östrogen-positiven Zellen.
2. Die Fläche des größten AgNORs im Zellkern ist bei östrogen-positiven Zellen weitaus größer als bei östrogen-negativen Zellen. Es zeigte sich aber, daß die bei östrogen-positiven Zellen gemessenen „größten AgNORs“ so große Flächen aufwiesen, daß sie keinen Einzel-AgNORs entsprechen konnten. Diese großen Flächen entsprechen AgNOR-Clustern. Durch diese verstärkte Clusterung bei östrogen-positiven Zellen kommt es aber bekanntlich zu einem optischen „Ineinanderfließen“ der Einzelstrukturen und damit zu einem methodisch bedingten Überschätzen der wahren Fläche (siehe Kapitel 1.2; Seite 9-10).

Veranschaulicht man sich die gegensätzlichen Auswirkungen einerseits der geringeren Fläche der Einzel-AgNORs bei östrogen-negativen Zellen und andererseits der Clusterung und dem damit verbundenen Meßfehler auf die AgNOR-Summenfläche pro Zellkern, so löst sich der scheinbare Widerspruch. Trotz höherer AgNOR-Anzahlen bei östrogen-negativen Zellen ist die niedrigere AgNOR-Summenfläche im Vergleich zu östrogen-positiven Zellen erklärbar.

Da aber die AgNOR-Summenfläche pro Zellkern bei östrogen-positiven Zellen durch den clusterungsbedingten Fehler zu groß bestimmt wird, ist eine Diskussion und Interpretation dieser Meßwerte im Vergleich zu den östrogen-negativen Zellen nicht zulässig. Jedoch lassen sich andere Schlußfolgerungen ziehen. REEVES et al. 1984 zeigten, daß niedrig differenzierte Zellen Einzel-AgNORs geringerer Fläche im Vergleich zu Zellen höherer Differenzierung aufweisen. Da die Einzel-AgNORs östrogen-negativer Zellen bei der vorliegenden Untersuchung deutlich kleiner als bei östrogen-positiven Zellen sind, ist dies ein weiterer Beleg höherer Malignität der östrogen-negativen Zellen.

Bei östrogen-positiven Zellen des Mammakarzinoms kommt es zu einem besonderen **Clusterungsphänomen**. RÜSCHOFF et al. 1994 beobachteten eine starke Clusterung der AgNORs ausschließlich in hochdifferenzierten Zellen von Urothelzelllinien. Dies steht im Einklang mit den vorliegenden Untersuchungen am Mammakarzinom. Man kann davon ausgehen, daß östrogen-positive Zellen im Vergleich zu östrogen-negativen Zellen höher differenziert sind [REMMELE et al. 1986; OSBORNE et al. 1990]. Eine ausgeprägte Clusterung war nur bei östrogen-positiven Zellen zu finden. Damit wäre im allgemeinen die Clusterung von AgNOR-dots im Zellkern als ein weiteres Kriterium einer höheren Zelldifferenzierung aufzufassen.

Östrogen-negative und östrogen-positive Zellen unterscheiden sich auch in der **räumlichen Lage** ihrer AgNORs im Zellkern. Da auch AgNOR-Anzahlen und Clusterungsphänomene die AgNOR-Lageparameter beeinflussen, lassen sich diese Ergebnisse jedoch nur schwer interpretieren oder verallgemeinern.

Variationskoeffizienten ausgewählter AgNOR-Merkmale beschreiben die Variabilität der Meßwerte und die Reproduzierbarkeit der Meßmethode [ÖFNER et al. 1995c] und haben auch prognostische Relevanz im Hinblick auf den weiteren Verlauf einer Tumorkrankheit [AUBELE et al. 1994a]. Obwohl diese Parameter offensichtlich auch biologische Sachverhalte beschreiben, besteht weiterhin Uneinigkeit über deren direkte Aussagekraft. Weiterhin sind Variationskoeffizienten relativ unabhängig gegenüber verschiedenen Störeinflüssen. Auch hier konnten deutliche Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Zellgruppen festgestellt werden. Die Variationskoeffizienten der mittleren korrigierten AgNOR-Anzahl sowie der mittleren Fläche des größten AgNORs bei östrogen-negativen und östrogen-positiven Zellen sind hochsignifikant verschieden. Diese Unterschiede belegen also auf den Tumor selbst bezogen nicht nur das Vorhandensein verschiedener AgNOR-Verteilungsmuster, sondern sie geben ebenfalls

Hinweise auf einen unterschiedlichen Beitrag beider Zellpopulationen zur Gesamtprognose.

Die Untersuchung möglicher Zusammenhänge zwischen AgNOR-Parametern und der **Östrogenpositivität** des Tumors (beschrieben durch den Estrogen-Receptor-Immunocytochemical-Assay) zeigte weitere wichtige Zusammenhänge. Dazu war jedoch wiederum die Unterscheidung von östrogen-negativen und östrogen-positiven Zellen notwendig, da sich bei der Gegenüberstellung mit dem Gesamttumor keine oder nur sehr schwache Korrelationen zeigten. Je größer die Östrogenpositivität des Tumors ist, desto geringer ist bei östrogen-negativen Zellen die mittlere AgNOR-Anzahl. Das bedeutet, daß eine höhere Differenzierung des Gesamttumors mit einer niedrigeren Proliferationstendenz auch der maligneren, östrogen-negativen Zellen einhergeht. Das gilt ebenso umgekehrt. Die AgNOR-Ausstattung östrogen-positiver Zellen korreliert nicht mit dem ER-ICA. Ihre AgNOR-Anzahlen bewegen sich hier unabhängig von der Positivität des Gesamttumors immer auf niedrigem Niveau und steigen auch bei sehr geringen ER-ICA-Werten nicht an. Man kann daraus schlußfolgern, daß die Population östrogen-positiver Zellen nur einen geringeren Beitrag zur Proliferation und Progression des Tumors leistet. Je höher also der Anteil östrogen-positiver Zellen ist, desto geringer ist die Proliferationstendenz des Tumors. Gleichzeitig wird mit steigender Östrogenpositivität des Tumors das Teilungsverhalten der östrogen-negativen Zellen eingeschränkt.

Bei der Betrachtung östrogen-positiver Zellen fiel auf, daß mit zunehmender Östrogenpositivität des Tumors die Flächen der AgNOR-Cluster größer werden. Dies ist ein weiterer Beleg dafür, daß eine höhere Zelldifferenzierung mit einer verstärkten Clusterung von AgNORs einhergeht.

Interessante Ergebnisse lieferte auch die Untersuchung von Zusammenhängen zwischen AgNOR-Parametern und anderen **histopathologischen Malignitätskriterien** des Tumors. Dazu wurden die AgNOR-Merkmale (getrennt betrachtet für „Gesamttumor“, „Östrogen-negative Zellen“ und „Östrogen-positive Zellen“) dem Kerngrading nach BLACK und ASIRE [BLACK et al. 1957], dem histopathologischen Grading nach BLOOM und RICHARDSON [BLOOM et al. 1957 und 1962] sowie der Mitoserate und der immunhistochemisch bestimmten Wachstumsfraktion (Ki-67) gegenübergestellt. Zusammenhänge konnten nur bei der korrigierten AgNOR-Anzahl und der AgNOR-Summenfläche pro Zellkern festgestellt werden. Diese korrelierten aber mit allen der genannten Malignitätsmarkern. Überraschend zeigte sich jedoch, daß hohe Korrelationen ausschließlich beim Vergleich mit der östrogen-negativen Zellpopulation zu verzeichnen waren. Je maligner sich das Mammakarzinom darstellt, desto größer ist bei östrogen-negativen Zellen die AgNOR-Anzahl und die AgNOR-Summenfläche. Demnach sind in diesem Kontext die mittlere korrigierte AgNOR-Anzahl pro Zellkern und die mittlere AgNOR-Summenfläche pro Zellkern als zusätzliche Malignitätskriterien des Mammakarzinoms aufzufassen. Die Tatsache, daß die AgNOR-Ausstattung östrogen-positiver Zellen von diesen Zusammenhängen unbeeinflusst bleibt, unterstreicht nochmals ihre untergeordnete Rolle im Hinblick auf die Tumorprogression.

5.6 BEZIEHUNGEN ZWISCHEN ÖSTROGENREZEPTOREN UND WACHSTUMSFRAKTION BEIM MAMMAKARZINOM

Auf die Beziehungen zwischen Östrogenrezeptorstatus und **Wachstumsfraktion** (Ki-67) des Tumors kann weiterhin nur indirekt über die AgNOR-Mengen geschlußfolgert werden.

Der Zusammenhang zwischen der Wachstumsfraktion (Ki-67) und den AgNOR-Mengen wird heute allgemein anerkannt. DERVAN et al. 1989 und RÜSCHOFF et al. 1990 konnten beim Mammakarzinom deutliche Korrelationen zwischen AgNOR-Anzahlen beziehungsweise AgNOR-Summenflächen und dem Ki-67-Index nachweisen.

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Studie korrelieren AgNOR-Anzahlen und AgNOR-Summenflächen ebenfalls deutlich mit der Wachstumsfraktion des Tumors. Dies gilt jedoch nur für die östrogen-negative Zellfraktion.

MUNAKATA et al. 1994 und HAROSKE et al. 1996b konnten in ähnlichen Studien mit einer Simultanfärbung des Ki-67-Antigens und der AgNORs nachweisen, daß Zellen die zur Wachstumsfraktion des Tumors gehören, deutlich höhere AgNOR-Anzahlen und AgNOR-Flächen aufweisen als Ki-67-negative Zellen.

Betrachtet man nun die vorliegenden Ergebnisse, welche die östrogen-negative Zellpopulation als Subgruppe mit stark erhöhten AgNOR-Anzahlen identifiziert und zieht weiterhin die Korrelation der AgNOR-Mengen östrogen-negativer Zellen zur Wachstumsfraktion hinzu, so legt dies einen Zusammenhang zwischen Wachstumsfraktion und östrogen-negativen Zellen des Mammakarzinoms nahe. Eine Identität zwischen Wachstumsfraktion und östrogen-negativer Zellgruppe ist eher unwahrscheinlich. Jedoch könnte die Wachstumsfraktion der Tumorzellen eine Teilmenge der östrogen-negativen Zellfraktion sein (oder umgekehrt). Der Nachweis bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

5.7 SCHLUßFOLGERUNGEN UND KONSEQUENZEN FÜR DIE AgNOR-VERMESSUNG BEIM MAMMAKARZINOM

Östrogen-negative und östrogen-positive Zellen des Mammakarzinoms unterscheiden sich deutlich hinsichtlich ihrer AgNOR-Ausstattung (siehe Tabelle 12).

Tab. 12: Hauptunterschiede zwischen östrogen-negativen und östrogen-positiven Zellen hinsichtlich ihrer AgNOR-Merkmale.

AgNOR-Merkmal	Östrogen-neg. Zellen	Östrogen-pos. Zellen
• Anzahl	hoch	niedrig
• Größe	kleiner	größer
• Clusterung	gering	ausgeprägt

Die AgNORs **östrogen-negativer Zellen** des Mammakarzinoms haben spezielle Eigenschaften. Im Kontext mit anderen Eigenschaften lassen sie sich als „bösartigere“ und möglicherweise prognosebestimmende Zellfraktion charakterisieren.

1. Die östrogen-negative Zellpopulation ist dabei die Subgruppe mit einer im Vergleich erhöhten Proliferationstendenz. Dies basiert in erster Linie auf dem Vorhandensein deutlich größerer AgNOR-Mengen im Zellkern. Die Untersuchungen von DERENZINI et al. 1989b und 1990 weisen klare Beziehungen zwischen AgNOR-Mengen und Tumorphiliferationsraten nach.
2. Weiter untermauert werden diese Thesen durch die Korrelationen zwischen den AgNOR-Mengen östrogen-negativer Zellen und anderen Malignitätskriterien, unter anderem dem BLOOM-RICHARDSON-Grading und der Wachstumsfraktion (Ki-67).
3. Bei östrogen-negativen Zellen sind bestimmte Differenzierungsmerkmale nicht vorhanden (Östrogenrezeptoren, AgNOR-Clusterung).
4. Es besteht wahrscheinlich eine Beziehung zwischen östrogen-negativen Zellen und der Wachstumsfraktion (Ki-67) des Tumors.

Folglich haben östrogen-negative Zellen wahrscheinlich einen stärkeren Einfluß auf die Progression der Tumorkrankheit und damit auf die Prognose. Der Beweis dafür konnte am vorliegenden Tumormaterial leider nicht erbracht werden, da noch keine follow-up-Daten zur Verfügung stehen. Das ist ein weiterer Anstoß für zukünftige Untersuchungen.

Die AgNOR-Ausstattung **östrogen-positiver Zellen** des Mammakarzinoms unterliegt ebenfalls bestimmten Gesetzmäßigkeiten, ist jedoch von geringerem Informationswert.

1. Diese Zellgruppe ist vor allem durch ihre niedrigeren AgNOR-Anzahlen gekennzeichnet und damit auch geringer proliferationsaktiv. Diese AgNOR-Mengen bewegen sich unabhängig von der Östrogenpositivität des Gesamttumors immer auf niedrigem Niveau und steigen auch bei sehr geringen ER-ICA-Werten nicht an.
2. Weiterhin sind östrogen-positive Zellen Träger verschiedener Merkmale einer höheren Zelldifferenzierung (Vorhandensein von Östrogenrezeptoren, AgNOR-Clusterung).
3. Es zeigten sich keine oder nur sehr schwache Korrelationen der AgNOR-Merkmale zu wichtigen Malignitätskriterien des Tumors.
4. Sobald ein Mammakarzinom östrogen-positive Anteile besitzt, ist selbst die Größe des prozentualen Anteils der östrogen-positiven Zellen sowie die Graduierung der Färbeintensität von untergeordnetem Interesse, da sie keine zusätzlichen prognostischen Informationen beinhalten [BOJAR 1995].

Es ist mit hoher Wahrscheinlichkeit sinnvoll, nur die Zellpopulation zu isolieren und zu untersuchen, welche die Prognose der Tumorkrankheit diktiert. Demnach ist eine AgNOR-Vermessung ausschließlich in den östrogen-negativen Tumoranteilen vorzuschlagen.

6 ZUSAMENFASSUNG

Das Mammakarzinom ist als häufigstes Malignom der Frauen der westlichen Welt nach wie vor Gegenstand intensiver Forschung. Dabei wird vor allem eine Verbesserung der Prognoseeinschätzung angestrebt.

Trotz großer Fortschritte in den biologischen Grundlagendisziplinen existieren bis heute keine präzisen Prognosefaktoren. Dies gilt insbesondere, wenn ein negativer axillärer Lymphknotenstatus vorliegt.

Im Rahmen der Einschätzung der Proliferationsaktivität von Tumoren erlebte die Erforschung der seit 1931 bekannten AgNORs in den letzten Jahren eine Renaissance. AgNORs sind mit einer einfachen Versilberungstechnik visualisierte Nukleolusorganisierende Regionen (NORs). Diese NORs wiederum bestehen aus Schleifen ribosomaler DNA und assoziierten, argyrophilen Regulatorproteinen (NORAPs). AgNORs lassen sich durch Anzahl-, Flächen- und Lageparameter beschreiben. Die Methode der Wahl zur Quantifizierung der AgNORs ist die computergestützte digitale Bildanalyse. AgNORs werden in erster Linie zu den Proliferationsmarkern gezählt, sie bieten jedoch auch Hinweise auf die Zelldifferenzierung und die Prognose von Tumorerkrankungen.

Die Bestimmung des Östrogenrezeptorstatus beim Mammakarzinom ist seit vielen Jahren Bestandteil der pathologischen Routinediagnostik. Neben einer Einschätzung der Sensibilität des Tumors gegenüber antiöstrogener Therapie lassen sich in begrenztem Rahmen auch Aussagen über die Prognose der Tumorkrankheit machen. Dabei ist jedoch die genaue Quantität der Östrogenrezeptoren von untergeordneter Bedeutung. Der Östrogenrezeptorstatus läßt sich sowohl immunhistochemisch (ER-ICA) als auch biochemisch (EIA) bestimmen.

AgNOR-Merkmale und Östrogenrezeptorstatus kennzeichnen unterschiedliche und zum Teil auch gegensätzliche biologische Tumoreigenschaften. Bestehende Zusammenhänge zwischen beiden Markern wurden bisher nur auf Fallebene, daß heißt durch den Vergleich von Ergebnissen unterschiedlicher Bestimmungsmethoden, jedoch nie auf Zellebene diskutiert.

Um eine direkte Beziehung zwischen beiden Parametern innerhalb der Tumorzelle nachzuweisen, wurde eine neue Färbemethode entwickelt, mit der es möglich ist, AgNORs und Östrogenrezeptoren im selben histologischen Schnitt darzustellen. Im ersten Färbeschritt dieser Simultanfärbung werden die Östrogenrezeptoren mit Hilfe einer immunhistochemischen Technik markiert. Im zweiten Schritt werden die argyrophilen Proteine der NORs mit einer Versilberungsmethode dargestellt.

Nach Standardisierung des Färbealgorithmus wurde mit Hilfe einer Testserie und deren vergleichenden Auswertung eine mögliche gegenseitige Beeinflussung der Färbemethoden ausgeschlossen.

Zur Quantifizierung des Färbeergebnisses mußten die AgNORs in den farbig markierten Tumorzellen vermessen werden. Diese Aufgabe wurde am Farb-Bildverarbeitungssystem AMBA gelöst. Dazu war es notwendig, das Vermessungsprogramm AMBA*norcolor* zu entwerfen und auf die spezielle Problemstellung zuzuschneiden.

Zur Vermessung kamen letztendlich histologische Schnitte von 49 Mammakarzinomen verschiedener histopathologischer Differenzierung. Es wurden jeweils 100 östrogen-positive und östrogen-negative Tumorzellkerne in die Messungen einbezogen.

Östrogen-positive und östrogen-negative Zellen des Mammakarzinoms unterscheiden sich deutlich hinsichtlich ihrer AgNOR-Ausstattung.

Dabei sind östrogen-negative Zellen vor allen Dingen durch größere Mengen kleinerer AgNORs gekennzeichnet. Dies ist einerseits ein Merkmal von Zellen niedriger histopathologischer Differenzierung [REEVES et al. 1984]. Andererseits kennzeichnet die Korrelation zwischen AgNOR-Anzahlen und Tumorphilisationsraten [DERENZINI et al. 1989b und 1990] die östrogen-negativen Tumorzellen als stärker proliferationsaktive Zellpopulation. Weiterhin existiert eine Korrelation zur Wachstumsfraktion (Ki-67) des Tumors.

Bei östrogen-positiven Zellen kommt es bei geringeren AgNOR-Anzahlen zu einem besonderen Clusterungsphänomen. Demnach weist diese Zellgruppe eine im Vergleich niedrigere Proliferationsaktivität auf. Nach RÜSCHOFF et al. 1994 ist eine zunehmende Zusammenlagerung der AgNOR-Einzelstrukturen ein Ausdruck einer höheren Zelldifferenzierung.

Bei der Untersuchung von Zusammenhängen zwischen den AgNOR-Merkmalen der Tumorzellen und anderen histopathologischen Malignitätskriterien des Tumors, wie zum Beispiel dem BLOOM-RICHARDSON-Grading oder der Wachstumsfraktion (Ki-67), wurde zwischen den Kategorien „Gesamtumor“, „Östrogen-negative Zellen“ und „Östrogen-positive Zellen“ unterschieden. Überraschend zeigten sich hier hohe Korrelationen ausschließlich bei den östrogen-negativen Zellen. Die AgNOR-Ausstattung östrogen-positiver Zellen bleibt von diesen Zusammenhängen unbeeinflusst.

Je größer die Östrogenpositivität des Gesamtumors (beschrieben durch den Estrogen-Receptor-Immuno-Cytochemical-Assay), desto niedriger ist die AgNOR-Anzahl bei östrogen-negativen Zellen. Das bedeutet, daß eine zunehmende Differenzierung des Tumors ebenfalls Auswirkungen auf die Teilungstendenz der eigentlich proliferationsaktiven Zellen des Tumors hat.

Nach den vorliegenden Ergebnissen konnten die östrogen-negativen Tumorzellen des Mammakarzinoms als Fraktion mit deutlich höherer Proliferationsaktivität charakterisiert werden. Diese Zellgruppe läßt sich mit der Simultanfärbung für Östrogenrezeptoren und AgNORs selektiv darstellen und analysieren.

Die Eigenschaften der östrogen-negativen Tumorzellen legen einen bestimmenden Einfluß auf die Progression des Tumorleidens nahe. Somit wird die Krankheitsprognose von Patientinnen mit östrogen-positiven Mammakarzinomen wahrscheinlich von der Proliferationsaktivität der östrogen-negativen Tumorzellfraktion bestimmt. Eine genaue Untersuchung dieses Zusammenhangs bleibt weiteren Untersuchungen auf Grundlage entsprechender follow-up-Daten vorbehalten.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. ADAMI HO, MALKER B, HOLMBERG L, PERSSON I, STONE B. The relation between survival and age at diagnosis in breast cancer. *N Engl J Med* 1986; *315*: 559-563.
2. ADAMS DJ, McGUIRE WL. Quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for estrogen-regulated Mr 24000 protein in human breast tumors: correlation with estrogen and progesterone receptors. *Cancer Res* 1985; *45*: 2445-2449.
3. ALLEGRA JC, LIPPMAN ME, SIMON R, THOMPSON EB, BARLOCK A, GREEN L, HUFF KK, DO HMT, AITKEN SC, WARREN R. Association between steroid hormone receptor status and disease free interval in breast cancer. *Cancer Treat Rep* 1979; *63*: 1271-1277.
4. ANDERSEN J, ORNTOFT TF, POULSEN HS. Immunohistochemical demonstration of estrogen receptors (ER) in formalin-fixed, paraffin-embedded human breast cancer tissue by use of a monoclonal antibody to ER. *J Histochem Cytochem* 1988; *36*: 1553-1560.
5. AUBELE M, AUER G, JÜTTING U. Prognostic value of AgNORs in breast cancer. *Zentralbl Pathol* 1994; *140*: 55-60. (1994a)
6. AUBELE M, BIESTERFELD S, DERENZINI M, HUFNAGL P, MARTIN H, ÖFNER D, PLOTON D, RÜSCHOFF J. Guidelines of AgNOR quantitation. *Zentralbl Pathol* 1994; *140*: 107-108. (1994b)
7. AZIZ DC. Quantitation of estrogen and progesterone receptors by immunocytochemical and image analyses. *Am J Clin Pathol* 1992; *98*: 105-111.
8. BACUS S, FLOWERS JL, PRESS MF, BACUS JW, McCARTY KS. The evaluation of estrogen receptor in primary breast carcinoma by computer-assisted image analysis. *Am J Clin Pathol* 1988; *90*: 233-239.
9. BACUS S, GOLDSCHMIDT R, CHIN D, MORAN G, WEINBERG G, BACUS JW. Biological grading of breast cancer using antibodies to proliferating cells and other markers. *Am J Path* 1989; *135*: 783-792.
10. BADDOURA FK, COHEN C, UNGER ER, DEROSE PB, CHENGGIS M. Image analysis for quantitation of estrogen receptor in formalin-fixed paraffin-embedded sections of breast carcinoma. *Mod Pathol* 1991; *4*: 91-95.

11. BIER B, BANKFALVI A, GROTE L, BLASIUS S, ÖFNER D. Wet autoclave pretreatment for immunohistochemical demonstration of oestrogen receptors in routinely processed breast carcinoma tissue. *Histochem J* 1995; 27: 148-154.
12. BIGRAS G, MARCELPOIL R, BRAMBILLA E, BRUGAL G. Interest of targeting AgNORs measurement in cycling cells: in vivo cell kinetic evaluation of non-small cell lung cancer. *Anal Cell Pathol* 1996; 11: 183-198.
13. BLACK MM, SPEER FD. Nuclear structure in cancer tissues. *Surg Gynecol Obstet* 1957; 105: 97-102.
14. BLOOM HJG, RICHARDSON WW. Histological grading and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 1957; 11: 359-377.
15. BLOOM HJG, RICHARDSON WW, HARRIES EJ. Natural history of untreated breast cancer (1805-1933). Comparison of untreated and treated cases according to histological grade of malignancy. *Br Med J* 1962; 28: 213-221.
16. BLOOM ND, TOBIN EH, SCHREIBMANN B, DEGENSHEIN GA. The role of progesterone receptors in the management of advanced breast cancer. *Cancer* 1980; 45: 2992-2997.
17. BOCKMÜHL U, THEISSIG F, DIMMER V, KUNZE KD. The impact of nucleolar organizer regions for the lymph node spread and prognosis of invasive ductal mammary carcinoma. *Pathol Res Pract* 1991; 187: 437-443.
18. BOJAR H. Stellenwert der immunhistochemischen Östrogen-, 15-Progesteron-Rezeptoranalyse. Vortrag auf der 15. Wissenschaftlichen Tagung der Deutschen Gesellschaft für Senologie. Leipzig. 15. -17. Oktober 1995.
19. BRUGAL G. Interpretation of proliferation markers. *In: Compendium on the computerized cytology and histology laboratory. Tutorials of Cytology* 1994: 234-240.
20. BUSCH H, SMETANA K. The nucleolus. *In: The nucleolus.* New York: Academic Press 1970: 448-463.
21. CARTER CL, ALLEN C, HENSON DE. Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24.740 breast cancer cases. *Cancer* 1989; 63: 181-187.

22. CHARPIN C, MARTIN PM, JACQUEMIER J, LAVAUT MN, POURREAU-SCHNEIDER N, TOGA M. Estrogen Receptor Immunocytochemical Assay (ER-ICA): computerized image analysis system, immunoelectron microscopy, and comparisons with estradiol binding assays in 115 breast carcinomas. *Cancer Res (suppl.)* 1986; 46: 4271s-4277s.
23. CIOCCA DR, STATI AO, AMPRINO DE CASTRO MM. Colocalization of estrogen and progesterone receptors with an estrogen-regulated heat shock protein in paraffin sections of human breast and endometrial cancer tissue. *Breast Cancer Res Treat* 1990; 16: 243-251.
24. CROCKER J, BOLDY DAR, EGAN MJ. How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. *J Pathol* 1989; 158: 185-188.
25. DELEENER A, CASTELAIN PH, PREAT V, DEGERLACHE J, ALEXANDRE H, KIRSCH-VOLDERS M. Changes in nucleolar transcriptional activity and nuclear DNA content during the first steps of rat hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 1987; 8: 195-201.
26. DERENZINI M, NARDI F, FARABEGOLI F. Distribution of silver-stained interphase nucleolar organizer regions as a parameter to distinguish neoplastic from non-neoplastic cells in human effusions. *Acta Cytol* 1989; 33: 491-498. (1989a)
27. DERENZINI M, PESSION A, FARABEGOLI F. Relationship between interphasic nucleolar organizer regions and growth rate in two neuroblastoma cell lines. *Am J Pathol* 1989; 134: 925-932. (1989b)
28. DERENZINI M, PESSION A, TRERÈ D. Quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in cancer cells. *Lab Invest* 1990; 63: 137-140.
29. DERVAN PA, GILMARTIN LG, LOFTUS BM, CARNEY DN. Breast carcinoma kinetics: argyrophilic nucleolar organizer region counts correlate with Ki-67-scores. *Am J Clin Pathol* 1989; 92: 401-407.
30. DEVLEESCHOUWER N, OLEA-SERRANO N, LECLERCQ G, DEGROS N, HEUSON JC. Induction of progesterone receptor in an estrogen, progesterone receptor-negative breast cancer cell line. *J Steroid Biochem* 1986; 24: 365-368.
31. DEVLEESCHOUWER N, FAVERLY D, KISS R, LEGROS N, DELAUNOIT Y, RYCKAERT C, ANDRY M, LENGLET G, PARIDAENS R, GOMPEL CM. Comparison of biochemical and immunoenzymatic macromethods and a new immunocytochemical micromethod for assaying estrogen receptors in human breast carcinomas. *Acta Cytol* 1988; 32: 816-824.

32. EORTC. Revision of the standards for the assessment of hormone receptors in human breast cancer. Report of the 2nd EORTC-workshop, held on 16-17 March 1979, in the Netherlands Cancer Institute. *Eur J Cancer* 1980; *16*: 1513-1515.
33. ESTEBAN JM, KANDALAFT PL, MEHTA P, ODOM-MARYON TL, BACUS S, BATTIFORA H. Improvement of the quantification of estrogen and progesterone receptors in paraffin-embedded tumors by image analysis. *Am J Clin Pathol* 1993; *99*: 32-38.
34. EVANS HJ, BUCKLAND RA, PARDUE ML. Location of genes coding for 18s and 28s ribosomal DNA in human genome. *Chromosoma* 1974; *48*: 405-426.
35. FAKAN S, HERNANDEZ-VERDUN D. The nucleolus and the nucleolar organizer region. *Biol Cell* 1986; *56*:189-206.
36. FERGUSON-SMITH MA. The sites of nucleolus formation in human pachytene chromosomes. *Cytogenetics* 1964; *3*: 124-125
37. FIELD D, FITZGERALD PH, SINN FYT. Nucleolar silver-staining patterns related to cell cycle phase and cell generation of PHAQ-stimulated human lymphocytes. *Cytobios* 1984; *41*: 23-33.
38. FISHER B, REDMOND C, FISHER ER, CAPLAN R and other contributing National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Investigators. Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node-negative breast cancer patients: Findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. *J Clin Oncol* 1988; *6*: 1076-1087.
39. FISHER ER, SASS R, FISHER B. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Project for Breast Cancers. Protocol No. 4: X. Discriminats for ten-year treatment failure. *Cancer* 1984; *53*: 712-723.
40. GIMÉNEZ-MAS J, GALLEGU-CALVO P, SANZ-MONCASI P. AgNOR evaluation by image processing methods. *Anal Quant Cytol Histol* 1996; *18*: 9-18.
41. GIRI DD, NOTTINGHAM JF, LAWRY J, DUNDAS SAC, UNDERWOOD SAC. Silver-binding nucleolar organizer regions (AgNORs) in benign and malignant breast lesions: correlation with ploidy and growth phase by DNA flow cytometry. *J Pathol* 1989; *157*: 307-313.

42. GOODPASTURE C, BLOOM SE. Visualizazion of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 1975; 53: 37-50.
43. GREENE GL, NOLAN C, ENGLER JP, JENSEN EV. Monoclonal antibodies to human estrogen receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 5115-5119.
44. GUSKI H, WINZER KJ, HUFNAGL P, WOLF G, REICHERT S. Automated grading in breast cancer by image analysis of histological sections. *Acta Sterol* 1990; 9: 259-270.
45. GUSKI H, HUFNAGL P, WINZER KJ. Nucleolus organizer regions in diagnostic tumor pathology. *In*: Frolov VA, Demurov EA, Drogoval GM, Drozdova GA (Eds.): *Pathology of the visceral regulations and tissue growth*. Moscow 1995: Isdatelstvo PAIMS: 29-32.
46. GUSKI H, WINZER KJ, HUFNAGL P, KRAUSE M. AgNORs and prognostic evaluation of atypical ductal hyperplasia and carcinoma in situ of the breast. *E J Pathol* 1997; 3.1: 971-09.txt.
47. HAROSKE G, DIMMER V, FRIEDRICH K, MEYER W, THIEME B, THEISSIG F, KUNZE KD. Nuclear image analysis of immunohistochemically stained cells in breast carcinoma. *Histochem Cell Biol* 1996; 105: 479-485. (1996a)
48. HAROSKE G, DIMMER V, KOKOT R, THEISSIG F, KUNZE KD. AgNOR-quantitation in proliferating breast cancer cells. Abstract at the „Fourth International Workshop on Application of AgNORs in Pathology“. September 27-29; 1996. Taormina, Italy. Abstract book: 18. (1996b)
49. HEITZ E. Nukleolen und Chromosomen der Gattung Vicia. *Planta* 1931; 15: 495-505.
50. HERNANDEZ-VERDUN D, BOUTEILLE M, EGE T, RINGERTZ NR. Fine structure of nucleoli in micronucleated cells. *Exp Cell Res* 1979; 244: 223-235.
51. HORWITZ KB, McGUIRE WL. Estrogen and progesterone: their relationship in hormone dependent breast cancer. *In*: *Progesterone receptors in normal and neoplastic tissues*. Herausgegeben von: McGuire WL, Raynaud JP, Bauliez EE. Raven Press. New York. 1977: 103-124.
52. HORWITZ KB, KOSEKI Y, McGUIRE WL. Estrogen control of progesterone receptor: Role of estradiol and antiestrogen. *Endocrinology* 1978; 103: 1742-1751.

53. HOWELL A, HARLAND RNL, BRAMWELL VHC. Steroid-hormone receptors and survival after first relapse in breast cancer. *Lancet* 1984; *1*: 588-591.
54. HOWELL WM, BLACK DA. Controlled silver staining of nucleolar organizer regions with a protective colloid developer. A 1-step method. *Experientia* 1980; *36*: 1014-1017.
55. HSU TC, SPIRITO SE, PARDUE ML. Distribution of 18+28s ribosomal genes in mammalian genomes. *Chromosoma* 1975; *53*: 25-36.
56. HUBAY CA, ARAFAH B, GORDON NH, GUYTON SP, CROWE JP. Hormone receptors. An update and application. *Surg Clin North Am* 1984; *64*: 1155-1172.
57. HUFNAGL P, GUSKI H, MEYER R, WASSILEW G, WENZELIDES K. Comparison of conventional morphometry and image analysis for the solution of histomorphometric problems. *Gegenbaurs Morphol Jahrb* 1989; *135*: 145-150.
58. HUFNAGL P, GUSKI H, SCHULZ HJ. Measuring of AgNORs using image analysis. *Zentralbl Pathol* 1994; *140*: 31-35.
59. HURLIMANN J, GEBHARDT S, GOMEZ F. Oestrogen receptor, progesterone receptor, pS2, ER D5, HSP 27 and cathepsin D in invasive ductal breast carcinomas. *Histopathology* 1993; *23*: 239-248.
60. JENSEN EV, DESOMBRE ER. Estrogen-receptor interaction. *Science (Wash. DC)* 1973; *182*: 126-134.
61. JENSEN EV, DESOMBRE ER. The diagnostic implicates of steroid binding in malignant tissues. *Adv Clin Chem* 1977; *19*: 57-89.
62. KING RJB, COFFER AI, GILBERT J. Histochemical studies with a monoclonal antibody raised against partially purified soluble estradiol receptor preparation from a human myometrium. *Cancer Res* 1985; *45*: 5728-5733.
63. KING WJ, GREENE GL. Monoclonal antibodies localize estrogen receptor in nuclei of target cells. *Nature (Lond.)* 1984; *307*: 745-747.
64. KLINGA M, KAUFMANN M, RUNNEBAUM B. Steroidrezeptoren beim Mammakarzinom. In: *Neue Konzepte der Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms*. Herausgegeben von: Kubli F. Springer Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo. 1984: 217-225.

65. KNIGHT WA, LIVINGSTON RB, GREGORY EJ, McGUIRE WL. Estrogen receptor as an independent prognostic factor for early recurrence in breast cancer. *Cancer Res* 1977; *37*: 4669-4671.
66. LECLERCQ G, BOJAR H, GOUSSARD J, PICHON MT, NICHOLSON RA, PIFANELLI A, POUSSETTE A, THORPE S, LONSDORFFER M. Abbott monoclonal enzyme immunoassay for the measurement of estrogen receptors in human breast cancer: A European multicenter study. *Cancer Res* 1986; *46* (suppl.): 4233s-4236s.
67. LEMIEUX P, FUQUA S. The role of estrogen receptor in tumor progression. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1996; *56*: 87-91.
68. LIPPMAN ME. Oestrogen-responsive human breast cancer in long-term tissue culture. *Nature (Lond.)* 1975; *256*: 592-593.
69. LIPPMAN ME, ALLEGRA JC. Quantitative estrogen receptor analyses: The response to endocrine and cytotoxic chemotherapy in human breast cancer and the disease-free interval. *Cancer* 1980; *46*: 2829-2834.
70. LYKKESFELD AE, BRIAND B. Indirect mechanism of oestradiol stimulation of cell proliferation of human breast cancer cell lines. *Br J Cancer* 1986; *53*: 29-35.
71. MANNI A, ARAFAH B, PEARSON OH. Oestrogen and progesterone receptors in the prediction of response of breast cancer to endocrine therapy. *Cancer* 1980; *46* (suppl.): 2838s-2841s.
72. MARTIN H, HUFNAGL P, WENZELIDES K, BEIL M. AgNORs in cells of urothelial carcinoma of the bladder. A quantitative study using automatic microscopic image analysis. *Zentralbl Pathol* 1991; *137*: 505-509.
73. MARTIN H. The importance of the AgNOR-analysis in malignant tumors. *Zentralbl Pathol* 1994; *140*: 14-22.
74. MARTIN PM, SHERIDAN PJ. Towards a new model for the mechanism of action of steroids. *J Steroid Biochem* 1982; *16*: 215-229.
75. MASOOD S. Immunocytochemical localization of estrogen and progesterone receptors in imprint preparations of breast carcinomas. *Cancer* 1992; *70*: 2109-2114.
76. MERCER WD, EDWARDS DP, CHAMNESS GC, McGUIRE WL. Failure of estradiol immunofluorescence in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer* 1980; *46*: 2859-2868.

77. McCARTY KS JR, MILLER LS, COX EB, KOWATH J, McCARTY KS SR. Estrogen receptor analyses: correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Arch Pathol Lab Med* 1985; *109*: 716-721.
78. MCCLELLAND RA, FINLAY P, WALKER KJ, NICHOLSON D, ROBERTSON JFR, BLAMEY RW, NICHOLSON RI. Automated quantitation of immunocytochemically localized estrogen receptors in human breast cancer. *Cancer Res* 1990; *50*: 3445-3450.
79. McGUIRE WL. Adjuvant therapy of node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 1989; *320*: 525-527.
80. McGUIRE WL, CLARKE GM. Prognostic factors and treatment decisions in axillary node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 1992; *326*: 1756-1761.
81. MILGROM EL, ATGER TM, BAULIEN EE. Mechanisms regulating the concentration and conformation of progesterone receptors in the uterus. *J Biol Chem* 1973; *248*: 6366-6374.
82. MILLER RT, HAPKE MR, GREENE GL. Immunocytochemical assay for estrogen receptor with monoclonal antibody D753P in routinely processed formaldehyde-fixed breast tissue. *Cancer* 1993; *71*: 3541-3546.
83. MOHLA S, CLEM-JACKSON N, HUNTER JB. Estrogen receptors and estrogen-induced gene expression in the rat mammary glands and uteri during pregnancy and lactation: Changes in progesterone receptor and RNA polymerase activity. *J Steroid Biochem* 1981; *14*: 1-8.
84. MOURAD WA, SNEIGE N, KATZ RL, ORDÓÑEZ NG. Correlation of two AgNOR counts with Ki-67 labeling index. *Diag Cytopath* 1994; *10*: 113-119.
85. MUNAKATA S, HENDRICKS JB. A multilabeling technique for simultaneous demonstration and quantitation of Ki-67 and nucleolar organizer regions (AgNORs) in paraffin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem* 1994; *42*: 789-793.
86. NEMOTO T, VANA J, BEDWANI RN, BAKER HW, MCGREGOR FH, MURPHY GP. Management and survival of female breast cancer. Results of a national survey by the American College of Surgeons. *Cancer* 1980; *45*: 2917-2924.

87. ÖFNER D, HITTMAYER A, MARTH C. Relationship between quantity of silver stained nucleolar organizer regions associated proteins (AgNORs) and population doubling time in ten breast cancer cell lines. *Pathol Res Pract* 1992; 188: 742-746.
88. ÖFNER D, BANKFALVI A, RIEHEMANN K, BIER B, BOCKER W, SCHMIDT KW. Wet autoclave pretreatment improves the visualization of silver-stained nucleolar organizer-region-associated proteins in routinely formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Mod Pathol* 1994; 7: 946-950.
89. ÖFNER D, AUBELE M, BIESTERFELD S, DERENZINI M, HUFNAGL P, PLOTON D, TRERE D, RÜSCHOFF J. Guidelines of AgNOR quantitation: first update. *Virchows Archiv* 1995; 427: 341. (1995a)
90. ÖFNER D, RIEDMANN B, MAIER H, HITTMAYER A, RUMER A, TÖTSCH M, SPECHTENHAUSER B, BÖCKER W, SCHMID KW. Standardized staining and analysis of argyrophilic nucleolar organizer region associated proteins (AgNORs) in radically resected colorectal adenocarcinoma- correlation with tumour stage and long- term survival. *J Pathol* 1995; 175: 441-448. (1995b)
91. ÖFNER D, RÜSCHOFF J, TRERÈ D, AUBELE M, DERENZINI M, SCHMID KW. Standardized morphometric silver stained nucleolar organizer region associated proteins (AgNOR) analysis- basic concepts. *Pathol Res Pract* 1995; 106: 236-238. (1995c)
92. OSBORNE CK, YOCHMOWITZ MG, KNIGHT WA, MCGUIRE WL. The value of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. *Cancer* 1980; 46 (suppl.): 2884s-2888s.
93. OSBORNE CK. Receptors. *In: Breast Diseases*, 2nd Edition. Herausgegeben von: Harris J, Hellman IC, Kinne D. JB Lippincott Company. Philadelphia. 1990: 214-229.
94. PARIDAENS R, SYLVESTER RJ, FERRAZZI E, LEGROS N, LECLERQ G, HEUSON JC. Clinical significance of the quantitative assessment of estrogen receptor in advanced breast cancer. *Cancer* 1980; 46: 2889-2895.
95. PLOTON D, MENAGER M, JEANNESSON P, HIMBER G, PIGEON F, ADNET JJ. Improvement in the staining and the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J* 1986; 18: 5-14.
96. PLOTON D. Structure and molecular organization of the nucleolus. *Zentralbl Pathol* 1994; 140: 3-6.

97. REEVES BR, CASEY G, SMITH S. Correlation of differentiation state and silver staining of nucleolar organizer regions in promyelocytic leukemia cell line HL-60. *Cancer Genet Cytogenet* 1984; 13: 159-166.
98. REMMELE W, HILDEBRAND U, HIENZ HA, KLEIN PJ, VIERBUCHEN M, BEHNKE LJ, HEICKE B, SCHEIDT E. Comparative histological, histochemical, immunohistochemical and biochemical studies on estrogen receptors, lectin receptors and Barr bodies in human breast cancer. *Virchows Arch (A)* 1986; 409: 127-147.
99. REMMELE W, STEGNER HE. Vorschlag zur einheitlichen Definition eines immunhistochemischen Östrogenrezeptornachweises (ER-ICA) im Mamma-karzinomgewebe. *Pathologe* 1987; 8: 138-140.
100. RIO MC. The pS2 gene, mRNA and protein: a potential marker for human breast cancer. *Cancer Cells* 1990; 2: 269-274.
101. RIOS MA. Receptors for epidermal growth factor and estrogen as predictors of relapse in patients with mammary carcinoma. *Anticancer Res* 1988; 8: 173-176.
102. ROSEN PP, GROSHEN S, SAIGO PE, KINNE DW, HELLMAN S. Pathological prognostic factors in stage I and stage II (T1N0M0) breast carcinoma: A study of 644 patients with median follow-up of 19 years. *J Clin Oncol* 1989; 7: 1239-1251.
103. ROSENMAN J, BERNARD S, KOHER C, LELAND W, VARIA M, NEWSOME J. Local recurrences in patients with breast cancer at the North Carolina Memorial Hospital (1970-1982). *Cancer* 1986; 57: 1421-1425.
104. ROTH K, WENZELIDES K. Das interaktive Bildverarbeitungssystem AMBA/R. *Gegenbaurs Morphol Jahrb* 1989; 135: 25-32.
105. ROUSSEL P, HERNANDEZ-VERDUN D. Identification of AgNOR-proteins, markers of proliferation related to ribosomal gene activity. *Exp Cell Res* 1994; 214: 465-472.
106. RÜSCHOFF J, PLATE K, BITTINGER A, THOMAS C. Nucleolar organizer regions (NORs). Basic concepts and practical application in tumor pathology. *Pathol Res Pract* 1989; 185: 878-885.
107. RÜSCHOFF J. Nukleolus-organisierende Regionen (NORs) in der pathomorphologischen Tumordiagnostik. *Veroff Pathol* 1992; 139: 1-144.

108. RÜSCHOFF J, FAUSER G, KNÜCHEL R, HOFSTÄDTER F. AgNOR quantification with special reference to staining patterns. Zentralbl Pathol 1994; 140: 23-30.
109. SAINSBURY JRC. Epidermal-growth-factor-receptors and estrogen receptor in human breast cancer. Lancet 1985; 1: 364-366.
110. SAINSBURY JRC, NICHOLSON S, ANGUS B, FARNDON JR, MALCOM AJ, HARRIS AL. Epidermal growth factor receptor status of histological subtypes of breast cancer. Br J Cancer 1988; 58: 458-460.
111. SANNINO P, SHOUSA S. Demonstration of oestrogen receptors in paraffin wax sections of breast carcinoma using the monoclonal antibody 1D5 and microwave oven processing. J Clin Pathol 1994; 47: 90-92.
112. SCHECHTER AL, STERN DF, VAIDYANATHAN L, DECKER SJ, DREBIN JA, GREEN MI, WEINBERG RA. The *neu* oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumor antigen. Nature (Lond.) 1984; 312: 513-516.
113. SEDLACEK SM, HORWITZ KB. The role of progestins and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. Steroids 1984; 44: 467-484.
114. SILVERBERG E, BORING CC, SQUIRES TS. Cancer statistics 1990. CA 1990; 40: 9-11
115. SLAMON DJ, CLARK GM, WONG SG, LEVIN WJ, ULLRICH A, MCGUIRE WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/*neu* oncogene. Science 1987; 235: 177-182.
116. SMITH R, CROCKER J. Evaluation of nucleolar organizer region-associated proteins in breast malignancy. Histopathology 1988; 12: 113-125.
117. SNIJDERS M, THEUNISSEN P. Immunohistochemischer Nachweis von Östrogen- und Progesteronrezeptoren in Paraffinschnitten. Pathologe 1990; 11: 236-239.
118. SPYRATOS F, MAUDELONDE T, BROUILLET JP, BRUNET M, DEFRENNE A, ROCHEFORT H. Cathepsin D: an important marker predicting metastasis in primary breast cancer. Lancet 1989; 2: 1115-1118.
119. THORPE SM. Immunological quantitation of nuclear receptors in human breast cancer: Relation of cytosolic estrogen and progesterone receptors. Cancer Res 1987; 47: 1830-1835.

120. THORPE SM, ROCHEFORT H, GARCIA M, FREISS G, CHRISTENSEN IJ. Cathepsin D association between high concentrations and poor prognosis in primary breast cancer. *Cancer Res* 1989; 49: 6008-6014.
121. TRERÈ D. Technical and methodological aspects of silver staining and measurement of nucleolar organizer region (NOR). *Zentralbl Pathol* 1994; 140: 11-14.
122. UNDERWOOD JCE. Oestrogen receptors in human breast cancer: review of histopathological correlations and critique of histochemical methods. *Diagn Histopath* 1983; 6: 1-22.
123. VARLEY JM. Patterns of silver staining of human chromosomes. *Chromosoma* 1977; 61: 207-214.
124. VARLEY JM, SWALLOW JE, BRAMMAR WJ, WITTAKER JL, WALKER RA. Alterations to either c-erbB-2 (*neu*) or c-myc protooncogenes in breast carcinoma correlate with poor short-term prognosis. *Oncogene* 1987; 1: 423-430.
125. WILLIAMS MR, TODD JH, ELLIS IO, DOWLE CS, HAYBITTLE JL, ELSTON CW, NICHOLSON RI, GRIFFITH K, BLAMEY RW. Oestrogen receptors in primary and advanced breast cancer: an eight year review of 704 cases. *Br J Cancer* 1987; 55: 67-73.
126. WHITE E, DALING JR, NORSTED TL, CHU J. Rising incidence of breast cancer among young women in Washington State. *JNCI* 1987; 79: 239-243.
127. WORLD HEALTH ORGANISATION. The World Health Organisation histological typing of breast tumors. 2nd Edition. *Am J Clin Path* 1982; 78: 806-816.

8 ANHANG

DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei Herrn Professor Dr. med. Hans Guski, der mich mit seinem Wissen und seinem langjährigen pathologischen Erfahrungsschatz immer unterstützte, herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Peter Hufnagl, der mir tatkräftig zur Seite stand, wertvolle methodische Hinweise gab und ständig bereit war, über Problemlösungen zu diskutieren. Auch Herr Dipl.-Ing. Trong-Nghia Nguyen-Dobinsky, Dr. Günter Wolf und Dr. Karl Roth waren vor allem bei technischen Problemen sehr hilfreich.

Außerdem möchte ich Frau Janzen und Frau Richter aus dem Histochemischen Labor danken. Durch ihre Hilfe wurde die Etablierung der neuen Simultanfärbung erst möglich.

Auch Frau Jaroszewski bin ich für ihre Hilfe bei der Besorgung der erforderlichen Literatur sehr dankbar.

LEBENS LAUF

Name: Lukas Günther
Geburtstag: 11. 05. 1971
Geburtsort: Suhl

Familienstand: ledig
Eltern: Priv.-Doz. Dr. med. Klaus Günther
Jutta-Kristine Günther, geb. Soika

Ausbildung:

1977-87	4. Polytechnische Oberschule Berlin Treptow
1987-89	Erweiterte Oberschule „Klement Gottwald“ Berlin Treptow
1989	Abitur
1989-90	Medizinisches Vorpraktikum in der Chirurgischen Klinik des Oskar-Ziethen-Krankenhauses Berlin
1990	Beginn des Studiums der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin (Charité)
1992	Physikum
1993	1. Staatsexamen
1995	2. Staatsexamen
1996	Studienaufenthalt am Groote-Schuur-Hospital der University of Cape Town, Republik Südafrika
1996-97	Praktisches Jahr
1997	3. Staatsexamen
Dezember 1997	Beginn des AIP an der Chirurgischen Universitätsklinik der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Lukas Günther

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, daß die vorliegende Arbeit von mir selbständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfaßt wurde. Diese Dissertation stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Die Anfertigung erfolgte unter ausschließlicher Verwendung der aufgeführten Literatur und Hilfsmittel.

Lukas Günther